

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平 7-322883

(43) 公開日 平成 7 年 (1995) 12 月 12 日

(51) Int. Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C12N 15/09	ZNA			
9/24				
C12P 19/14		7432-4B		
//(C12N 15/09	ZNA			
C12R 1:41)				

審査請求 未請求 請求項の数 22 F D (全 31 頁) 最終頁に続く

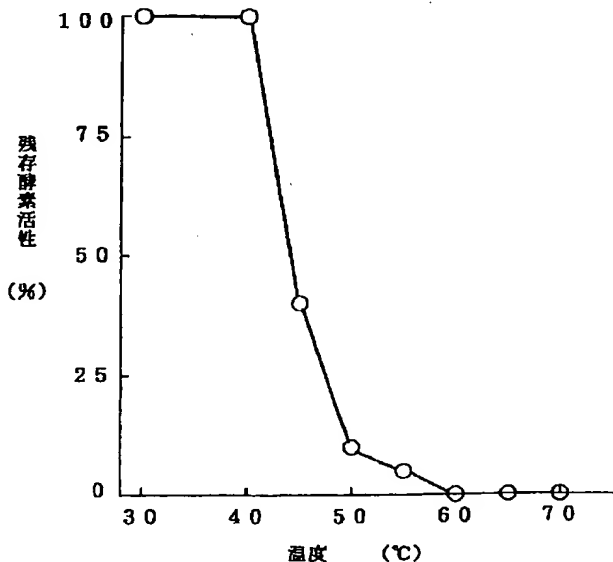
(21) 出願番号	特願平 7-58258	(71) 出願人	000155908 株式会社林原生物化学研究所 岡山県岡山市下石井 1 丁目 2 番 3 号
(22) 出願日	平成 7 年 (1995) 2 月 23 日	(72) 発明者	久保田 倫夫 大阪府茨木市主原町 12 番 6 号
(31) 優先権主張番号	特願平 6-47940	(72) 発明者	津▲さき▼ 桂二 岡山県倉敷市福田町古新田 472 番地
(32) 優先日	平 6 (1994) 2 月 23 日	(72) 発明者	丸田 和彦 岡山県岡山市桑野 525 番 3-214 号
(33) 優先権主張国	日本 (J P)	(72) 発明者	杉本 利行 岡山県岡山市東畦 695 番 44 号
(31) 優先権主張番号	特願平 6-90705		
(32) 優先日	平 6 (1994) 4 月 6 日		
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		

(54) 【発明の名称】 組換え型酵素とその製造方法並びに用途

(57) 【要約】

【目的】 グルコース重合度 3 以上の還元性澱粉糖から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する組換え型酵素と、その酵素の製造方法並びに用途を提供する。

【構成】 特定の作用を有する組換え型酵素と、その組換え型酵素を産生する形質転換体を培養し、培養物から組換え型酵素を採取する組換え型酵素の製造方法と、グルコース重合度 3 以上の還元性澱粉糖に組換え型酵素を作用させてその澱粉糖から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成させる工程を含んでなる還元性澱粉糖の変換方法を構成とする。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 グルコース重合度3以上の還元性澱粉糖から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する組換え型酵素。

【請求項2】 下記の理化学的性質を有する請求項1に記載の組換え型酵素。

(1) 分子量

約76,000乃至87,000ダルトン(SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動)

(2) 等電点

約3.6乃至4.6(等電点電気泳動)

【請求項3】 配列表における配列番号1又は2に示すアミノ酸配列かそれに相等的なアミノ酸配列を有する請求項1又は2に記載の組換え型酵素。

【請求項4】 請求項1に記載の組換え型酵素を産生する形質転換体を培養し、培養物から組換え型酵素を採取する組換え型酵素の製造方法。

【請求項5】 組換え型酵素が下記の理化学的性質を有する請求項4に記載の組換え型酵素の製造方法。

(1) 分子量

約76,000乃至87,000ダルトン(SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動)

(2) 等電点

約3.6乃至4.6(等電点電気泳動)

【請求項6】 組換え型酵素が配列表における配列番号1又は2に示すアミノ酸配列かそれに相等的なアミノ酸配列を有する請求項4又は5に記載の組換え型酵素の製造方法。

【請求項7】 形質転換体が、グルコース重合度3以上の還元性澱粉糖から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する酵素をコードするDNAと自律複製可能なベクターを含む組換えDNAを適宜宿主に導入してなる請求項4、5又は6に記載の組換え型酵素の製造方法。

【請求項8】 DNAが配列表における配列番号3又は4に示す塩基配列かそれに相等的な塩基配列又はそれらに相補的な塩基配列を有する請求項7に記載の組換え型酵素の製造方法。

【請求項9】 DNAが、遺伝子コードの縮重に基づき、配列表における配列番号1又は2に示すアミノ酸配列を変えることなく、配列表における配列番号3又は4に示す塩基配列における塩基の1個又は2個以上を他の塩基で置換したものである請求項7又は8に記載の組換え型酵素の製造方法。

【請求項10】 DNAが配列表における配列番号5又は6に示す塩基配列を有する請求項7、8又は9に記載の組換え型酵素の製造方法。

【請求項11】 DNAがリゾビウム属、アルスロバクター属、ブレバクテリウム属、フラボバクテリウム属、ミクロコッカス属、クルトバクテリウム属、マイコ

バクテリウム属又はテラバクター属の微生物に由来する請求項7、8、9又は10に記載の組換え型酵素の製造方法。

【請求項12】 宿主が大腸菌である請求項7、8、9、10又は11に記載の組換え型酵素の製造方法。

【請求項13】 自律複製可能なベクターがプラスミドベクターBluescript II SK(+)である請求項7、8、9、10、11又は12に記載の組換え型酵素の製造方法。

10 【請求項14】 形質転換体を炭素源及び窒素源を含むpH2乃至8の液体培地に植菌し、温度25乃至65℃で1乃至6日間培養する請求項4、5、6、7、8、9、10、11、12又は13に記載の組換え型酵素の製造方法。

【請求項15】 培養物中の組換え型酵素を遠心分離、濾過、濃縮、塩析、透析、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲル電気泳動及び／又は等電点電気泳動により採取する請求項4、5、6、7、8、9、10、11、12、13又は14に記載の組換え型酵素の製造方法。

【請求項16】 グルコース重合度3以上の還元性澱粉糖に請求項1に記載の組換え型酵素を作用させて該澱粉糖から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成させる工程を含んでなる還元性澱粉糖の変換方法。

【請求項17】 組換え型酵素が下記の理化学的性質を有する請求項16に記載の還元性澱粉糖の変換方法。

(1) 分子量

約76,000乃至87,000ダルトン(SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動)

(2) 等電点

約3.6乃至4.6(等電点電気泳動)

【請求項18】 組換え型酵素が配列表における配列番号1又は2に示すアミノ酸配列かそれに相等的なアミノ酸配列を有する請求項16又は17に記載の還元性澱粉糖の変換方法。

【請求項19】 還元性澱粉糖が澱粉又は澱粉質を酸及び／又はアミラーゼにより加水分解して得られたものである請求項16、17又は18に記載の還元性澱粉糖の変換方法。

【請求項20】 還元性澱粉糖がマルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース及び／又はマルトヘプタオースである請求項16、17、18又は19に記載の還元性澱粉糖の変換方法。

【請求項21】 還元性澱粉糖の濃度が50%(w/w)以下の水溶液中に組換え型酵素を共存せしめ、温度40乃至55℃、pH5乃至10で作用させる請求項16、17、18、19又は20に記載の還元性澱粉糖の変換方法。

【請求項 2 2】 非還元性糖質が α -グルコシルトレハロース、 α -マルトシルトレハロース、 α -マルトトリオシルトレハロース、 α -マルトテトラオシルトレハロース又は α -マルトペンタオシルトレハロースである請求項 1 6、1 7、1 8、1 9、2 0 又は 2 1 に記載の還元性澱粉糖の変換方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【産業上の利用分野】 この発明は、グルコース重合度 3 以上の還元性澱粉糖から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する新規な組換え型酵素とその製造方法並びに用途に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】 トレハロースは、グルコース 2 分子が還元性基同士結合した二糖類であり、天然には細菌、真菌、藻類、昆虫などに微量存在する。トレハロースは分子中に還元性基を持たないので、アミノ酸類の存在下で加熱しても褐変反応を起こすことがなく、着色や変質の懸念なく飲食物を甘味付けできる利点がある。しかしながら、従来の製造方法では所望量を入手するのが難しく、実際に飲食物の甘味付けに使われることは殆ど無かった。

【0 0 0 3】 これまでの製造方法は、微生物の菌体を利用する方法と、糖質に複合酵素系を作用させる方法とに大別される。前者の方法は、特開昭 5 0 - 1 5 4 4 8 5 号公報などにも見られるように、細菌、酵母などの微生物を栄養培地で増殖させ、培養物中の菌体からトレハロースを採取するものである。一方、後者の方法は、特開昭 5 8 - 2 1 6 6 9 5 号公報などにも見られるように、基質にマルトースを使用し、これにマルトース・フォス

30 フォリラーゼとトレハロース・フォスフォリラーゼからなる複合酵素系を作用させ、生成したトレハロースを系外に取出すものである。前者の方法は、微生物そのものの増殖は比較的容易なものの、トレハロースを菌体から採取するのに一連の複雑な工程を要し、しかも、菌体に含まれるトレハロースが 1 5 % (w/w) と僅少であるという問題があった。後者の方法は、トレハロースそのものの分離は比較的容易なものの、反応自体が 2 種類の酵素による平衡反応であり、しかも、その平衡が常時グルコースリン酸側に傾いていることから、基質を高濃度にして反応させ、トレハロースの収量を上げることが原理的に難しかった。

【0 0 0 4】 斯かる状況に鑑み、本発明者が、澱粉糖からトレハロース構造を有する糖質を生成する酵素につき鋭意検索したところ、リゾビウム・スピーシーズ M-1 1 やアルスロバクター・スピーシーズ Q 3 6 などの微生物が、グルコース重合度 3 以上の還元性澱粉糖から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成するという、従来未知の全く新規な酵素を産生することが判明した。この知見とあい前後して、この非還元性糖質は、

同じくリゾビウム・スピーシーズ M-1 1 やアルスロバクター・スピーシーズ Q 3 6 が産生する別の酵素により、ほぼ定量的にトレハロースとグルコース及び／又はマルトオリゴ糖に加水分解されることが判明した。これら酵素を併用することにより、澱粉を原料に所望量のトレハロースが比較的容易に得られることとなり、トレハロースに係わる前記課題は悉く解決されていくものと期待される。しかしながら、リゾビウム・スピーシーズ M-1 1 もアルスロバクター・スピーシーズ Q 3 6 も当該酵素の産生能が充分でなく、トレハロースや末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を大規模に製造しようとする、微生物を大量に培養しなければならないという問題がある。

【0 0 0 5】 一方、昨今の組換え DNA 技術の進歩には目覚ましいものがある。今日では、全アミノ酸配列が解明されていない酵素であっても、これをコードする遺伝子を単離し、その塩基配列を解明できれば、その酵素をコードする DNA を含む組換え DNA を作製し、これを微生物や動植物の細胞に導入して得られる形質転換体を培養することにより、比較的容易に所望量の酵素が取得できるようになった。斯かる状況に鑑み、両酵素をコードする遺伝子を突き止め、その塩基配列を解明するのが急務となっている。

【0 0 0 6】

【発明が解決しようとする課題】 この発明の目的は、組換え DNA 技術を応用して斯かる酵素を創製することにある。

【0 0 0 7】 この発明の別の目的は、その創製された酵素の製造方法を提供することにある。

【0 0 0 8】 この発明のさらに別の目的は、その創製された酵素を使用する還元性澱粉糖の変換方法を提供することにある。

【0 0 0 9】

【課題を解決するための手段】 この発明は、前記第一の課題を、グルコース重合度 3 以上の還元性澱粉糖から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する組換え型酵素により解決するものである。

【0 0 1 0】 この発明は、前記第二の課題を、その組換え型酵素を産生する形質転換体を培養し、培養物から組換え型酵素を採取する組換え型酵素の製造方法により解決するものである。

【0 0 1 1】 この発明は、前記第三の課題を、グルコース重合度 3 以上の還元性澱粉糖に組換え型酵素を作用させて該澱粉糖から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成させる工程を含んでなる還元性澱粉糖の変換方法により解決するものである。

【0 0 1 2】

【作用】 この発明による組換え型酵素は、グルコース重合度 3 以上の還元性澱粉糖に作用して末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する。

【0013】この発明の製造方法にしたがって形質転換体を培養すれば、所望量の組換え型酵素が比較的容易に得られる。

【0014】この発明の変換方法により、グルコース重合度3以上の還元性澱粉糖は、末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質に変換される。

【0015】この発明は、グルコース重合度3以上の還元性澱粉糖から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する、従来未知の全く新規な酵素の発見に基づくものである。斯かる酵素はリゾビウム・スピーシーズM-11やアルスロバクター・スピーシーズQ36の培養物から得ることができ（以下、それぞれ「酵素M-11」又は「酵素Q36」と云う。）、本発明者がカラムクロマトグラフィーを中心とする種々の精製方法を組合せてこの酵素を単離し、その性質・性状を調べたところ、その本質はポリペプチドであり、次のような理化学的性質を有することが判明した。

(1) 作用

グルコース重合度3以上の還元性澱粉糖から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する。

(2) 分子量

約76,000乃至87,000ダルトン（SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動）

(3) 等電点

約3.6乃至4.6（等電点電気泳動）

(4) 至適温度

pH7.0で60分間インキュベートすると、35乃至40℃付近に至適温度を示す。

(5) 至適pH

40℃で60分間インキュベートすると、pH6.4乃至7.2付近に至適pHを示す。

(6) 熱安定性

pH7.0で60分間インキュベートすると、35乃至40℃付近まで安定である。

(7) pH安定性

25℃で16時間インキュベートすると、pH5.5乃至11.0付近まで安定である。

【0016】次に、これら理化学的性質を解明すべく行なった実験について説明する。

【0017】

【実験例1 精製酵素の調製】

【0018】

【実験例1-1 酵素M-11の精製】500ml容三角フラスコにマルトース2.0%（w/v）、ペプトン0.5%（w/v）、酵母エキス0.1%（w/v）、磷酸水素二ナトリウム0.1%（w/v）及び磷酸二水素カリウム0.1%（w/v）を含む液体培地（pH7.0）を100mlずつとり、120℃で20分間オートクレープして滅菌した。冷却後、三角フラスコ内の液体培地にリゾビウム・スピーシーズM-11を植菌

し、回転振盪下、27℃で24時間種培養した。別途、30l容ジャーファーマンタに上記と同組成の液体培地を20lとり、滅菌後、上記で得た種培養液を1%（v/v）接種し、液体培地をpH6乃至8に保ちつつ、30℃で24時間通気攪拌培養した。

【0019】次に、上記で得た培養物約18lを超高压菌体破碎装置にとり、菌体を破碎後、遠心分離により採取した上清約16lに硫酸アンモニウムを20%飽和になるように加え、4℃で1時間静置後、遠心分離により沈澱部を除去した。得られた上清に60%飽和になるように硫酸アンモニウムを加え、4℃で24時間静置後、沈澱部を遠心分離により採取し、最少量の10mM磷酸緩衝液（pH7.0）に溶解し、10mM磷酸緩衝液（pH7.0）に対して24時間透析後、遠心分離により不溶物を除去した。得られた上清を予め10mM磷酸緩衝液（pH7.0）により平衡化させておいた東ソー製イオン交換クロマトグラフィー用カラム『DEAE-トヨパール』に負荷し、0Mから0.5Mに上昇する塩化ナトリウムの濃度勾配下、カラムに10mM磷酸緩衝液（pH7.0）を通液した。溶出液より酵素を含む画分を採取し、2M硫酸アンモニウムを含む50mM磷酸緩衝液（pH7.0）に対して10時間透析後、遠心分離により不溶物を除去した。その後、上清を予め2M硫酸アンモニウムを含む50mM磷酸緩衝液（pH7.0）により平衡化させておいた東ソー製疎水クロマトグラフィー用カラム『ブチルトヨパール』に負荷し、2Mから0Mに低下する硫酸アンモニウムの濃度勾配下、カラムに50mM磷酸緩衝液（pH7.0）を通液した。溶出液から酵素を含む画分を採取し、予め50mM磷酸緩衝液（pH7.0）により平衡化させておいた東ソー製ゲル濾過カラムクロマトグラフィー用カラム『トヨパールHW-55』に負荷し、カラムに50mM磷酸緩衝液（pH7.0）を通液し、溶出液から酵素を含む画分を採取した。このようにして精製した酵素M-11の比活性は約195単位/mg蛋白質であり、収量は培養物1l当たり約220単位であった。

【0020】なお、この発明を通じて、酵素の活性は次の方法により測定した活性値（単位）で表示する。すなわち、マルトペンタオースを1.25%（w/v）含む50mM磷酸緩衝液（pH7.0）を4mlとり、これに酵素液を1ml加え、40℃で60分間インキュベートして反応させた後、反応液を100℃で10分間加熱して反応を停止させる。反応液を蒸留水で10倍希釈した後、ソモギ・ネルソン法により還元力を測定する。当該酵素の1単位とは、上記条件下において、1分間にマルトペンタオース1μmolに相当する還元力を低下させる酵素の量と定義する。

【0021】

【実験例1-2 酵素Q36の精製】実験例1-1と同様にアルスロバクター・スピーシーズQ36を培養し、

培養物を処理したところ、比活性約200単位/mg蛋白質の精製酵素Q36が、培養物1l当たり、約295単位の収量で得られた。

【0022】

【実験例2 酵素の理化学的性質】

【0023】

【実験例2-1 作用】基質としてグルコース、マルトース、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース又はマルトヘプタオースを20% (w/v) 含む50mM磷酸緩衝液 (pH 10.7.0) に実験例1で得た精製酵素M-11又は精製酵素Q36を基質1g当たり2単位加え、40℃で48時

間反応させた。常法により反応物を脱塩した後、和光純薬製高速液体クロマトグラフィー用カラム『WB-T-330』に負荷し、溶出液の糖濃度を東ソー製示差屈折計『RI-8012型』でモニターしながら、室温下にてカラムに蒸留水を0.5ml/分の流速で通液することにより、反応物に含まれる糖質を分離した。表1及び表2に、それぞれ、酵素M-11または酵素Q36を加えた場合の反応物の糖組成を示す。なお、表中の糖質P1乃至P5は、反応により生成した糖質をグルコース重合度の小さい順に命名したものである。

【0024】

【表1】

基 質	反応物中の糖質	溶出時間(分)	組成(%)
グルコース	グルコース	33.4	100.0
マルトース	マルトース	28.5	100.0
マルトトリオース	P1	23.3	35.0
	+ マルトトリオース	25.9	85.0
マルトテトラオース	P2	21.6	85.6
	+ マルトテトラオース	24.1	14.4
マルトペンタオース	P3	19.7	92.7
	+ マルトペンタオース	22.6	7.3
マルトヘキサオース	P4	18.7	93.5
	+ マルトヘキサオース	21.4	6.5
マルトヘプタオース	P5	17.8	93.4
	+ マルトヘプタオース	21.0	6.6

【0025】

【表2】

基 質	反応物中の糖質	溶出時間(分)	組成(%)
グルコース	グルコース	33.4	100.0
マルトース	マルトース	28.5	100.0
マルトトリオース	P1	23.3	35.5
	+ マルトトリオース	25.9	64.5
マルトテトラオース	P2	21.6	85.8
	+ マルトテトラオース	24.1	14.2
マルトペンタオース	P3	19.7	92.9
	+ マルトペンタオース	22.6	7.1
マルトヘキサオース	P4	18.7	93.3
	+ マルトヘキサオース	21.4	6.7
マルトヘプタオース	P5	17.8	93.1
	+ マルトヘプタオース	21.0	6.9

【0026】表1及び表2の結果から明らかなように、酵素M-11及び酵素Q36は、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース及びマルトヘプタオースなどのグルコース重合度が3以上の還元性澱粉糖からは新たな糖質を生成するけれども、グルコース重合度が3を下回るグルコースやマルトースからは新たな糖質を生成しない。また、反応に

より生成した糖質はそれぞれ糖質P1乃至P5のみであり、糖質P2乃至P5の含量は固形分当たり85%以上と著しく高かった。

【0027】次に、糖質P1乃至P5を分離すべく、東京有機化学工業製強酸性カチオン交換樹脂『XT-1016 (Na⁺型)』を内径2.0cm、長さ1mのジャケット付きステンレス製カラム3本に充填し、これらカ

ラムを直列に連結した。そして、カラム内の温度を55℃に保ちつつ、カラムに糖質P1乃至P5のいずれかを含み前記反応物を別々に負荷した後、カラムに55℃の蒸留水をSV0.13の流速で通液した。溶出液の糖組成を調べ、糖質P1乃至P5のいずれかを固形分で97%以上含む画分を採取し、真空乾燥により粉末化した。このようにして精製した糖質P1乃至P5の還元力をソモギ・ネルソン法により調べたところ、いずれの糖質にも実質的な還元力は認められなかった。

【0028】さらに、糖質P1乃至P5を同定すべく、これら糖質のいずれかを50mgとり、50mM酢酸緩衝液(pH4.5)1mlに溶解後、グルコアミラーゼ

を1単位加え、40℃で6時間インキュベートした。表1及び表2に示す反応物の糖組成を高速液体クロマトグラフィーにより分析したところ、それぞれ表3及び表4に示すように、全ての反応物からグルコースとトレハロースが検出された。同様に、糖質P1乃至P5にβ-アミラーゼを作用させたところ、糖質P1及びP2がβ-アミラーゼの作用を受けなかったのに対して、糖質P3は1分子のマルトースと糖質P1を、糖質P4は1分子のマルトースと糖質P2を、また、糖質P5は2分子のマルトースと糖質P1を与えた。

【0029】

【表3】

糖質	グルコース(%)	トレハロース(%)	モル組成比*
P1	36.2	63.8	1.07
P2	52.0	48.0	2.06
P3	61.4	38.6	3.02
P4	68.3	31.7	4.09
P5	72.9	27.1	5.11

註：「モル組成比」は、トレハロース1モルに対するグルコースのモル数として計算した。

【0030】

【表4】

糖質	グルコース(%)	トレハロース(%)	モル組成比*
P1	36.0	64.0	1.07
P2	51.5	48.5	2.02
P3	61.6	38.4	3.05
P4	68.1	31.9	4.06
P5	72.5	27.5	5.01

註：「モル組成比」は、トレハロース1モルに対するグルコースのモル数として計算した。

【0031】表3及び表4の結果は、糖質P1乃至P5が1分子のトレハロースと1乃至5分子のグルコースにより構成されることを強く示唆している。また、グルコアミラーゼがマルトオリゴ糖におけるα-1,4結合及びα-1,6結合に特異的に切断することと、β-アミラーゼがマルトオリゴ糖におけるα-1,4結合をその末端よりマルトース単位で切断することから、糖質P1乃至P5は、グルコース又はグルコース重合度が2乃至5のマルトオリゴ糖の末端にトレハロース残基が1個結合した構造を有していると推定される。

【0032】以上の結果を総合的に判断すると、糖質P1乃至P5は、それぞれ、α-グルコシルトレハロース、α-マルトシルトレハロース、α-マルトトリオシルトレハロース、α-マルトテトラオシルトレハロース又はα-マルトペンタオシルトレハロースと同定され、

このことは、当該酵素にグルコース重合度3以上の還元性澱粉糖から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する作用のあることを裏付けている。

【0033】

【実験例2-2 分子量】ユー・ケー・レムリが『ネチャー』、第227巻、第680~685頁(1970年)に報告している方法に準じて精製酵素をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動したところ、酵素M-11、酵素Q36とも、分子量約76,000乃至87,000ダルトンに相当する位置に単一バンドが観察された。なお、このときの分子量マーカは、ミオシン(200,000ダルトン)、β-ガラクトシダーゼ(116,250ダルトン)、フォスフォリラーゼB(97,400ダルトン)、血清アルブミン(66,200ダルトン)及びオボアルブミン(45,000ダルトン)で

あった。

【0034】

【実験例2-3 等電点】等電点電気泳動法により測定したところ、酵素M-11、酵素Q36とも、約3.6乃至4.6に等電点を示した。

【0035】

【実験例2-4 至適温度】常法により、50mM磷酸緩衝液(pH7.0)中で60分間インキュベートする条件で試験したところ、図1又は図2に示すように、酵素M-11、酵素Q36とも、35乃至40℃付近に至適温度を示した。

【0036】

【実験例2-5 至適pH】常法により、pHの相違する50mM酢酸緩衝液、磷酸緩衝液又は炭酸ナトリウム-炭酸水素ナトリウム緩衝液中、40℃で60分間インキュベートする条件で試験したところ、図3又は図4に示すように、酵素M-11、酵素Q36とも、pH6.4乃至7.2付近に至適pHを示した。

【0037】

【実験例2-6 熱安定性】常法により、50mM磷酸緩衝液(pH7.0)中で60分間インキュベートする条件で試験したところ、図5又は図6に示すように、酵素M-11、酵素Q36とも、35乃至40℃付近まで安定であった。

【0038】

【実験例2-7 pH安定性】常法により、pHの相違する50mM酢酸緩衝液、磷酸緩衝液又は炭酸ナトリウム-炭酸水素ナトリウム緩衝液中、25℃で16時間インキュベートする条件で試験したところ、図7又は図8に示すように、酵素M-11、酵素Q36とも、pH5.5乃至11.0付近まで安定であった。

【0039】

【実験例2-8 N末端アミノ酸配列】常法により、アブライッド・バイオシステム製気相プロテイン・シーケンサ『470A型』を使用して分析したところ、酵素M-11は、N末端に配列表における配列番号7に示すアミノ酸配列を有していることが判明した。

【0040】同様に分析したところ、酵素Q36は、N末端に配列表における配列番号8に示すアミノ酸配列を有していることが判明した。

【0041】

【実験例2-9 部分アミノ酸配列】実験例1-1で得た精製酵素M-11を適量とり、10mMトリス-塩酸緩衝液(pH9.0)に対して4℃で18時間透析後、10mMトリス-塩酸緩衝液(pH9.0)を加えて酵素濃度を約1mg/mlとした。この溶液を約1mlとり、リジルエンドペプチダーゼを10μg加え、30℃で22時間インキュベートして酵素を部分加水分解した。加水分解物を、予め16%(v/v)水性アセトニトリルを含む0.1%(v/v)トリフルオロ酢酸によ

り平衡化させておいた資生堂製逆相高速液体クロマトグラフィー用カラム『カプセルパックC18』に負荷し、次いで、16%(v/v)から64%(v/v)に上昇するアセトニトリルの濃度勾配下、カラムに0.1%

(v/v)トリフルオロ酢酸を0.9ml/分の流速で通液した。そして、通液開始から約28分後又は約40分後に溶出したペプチド断片(以下、それぞれ「ペプチド断片A」又は「ペプチド断片B」と云う。)を含む画分を別々に採取し、真空乾燥後、50%(v/v)水性アセトニトリルを含む0.1%(v/v)トリフルオロ酢酸に溶解した。以後、実験例2-8と同様に分析したところ、ペプチド断片A及びBは、配列表における配列番号9及び10に示すアミノ酸配列を有していることが判明した

【0042】別途、実験例1-2で得た精製酵素Q36を上記と同様にして部分加水分解し、予め24%(v/v)水性アセトニトリルを含む0.1%(v/v)トリフルオロ酢酸により平衡化させておいた日本ミリポア・リミテッド製逆相高速液体クロマトグラフィー用カラム『マイクロボンドパックC18』に負荷し、24%(v/v)から44%(v/v)に上昇する水性アセトニトリルの濃度勾配下、カラムに0.1%(v/v)トリフルオロ酢酸を0.9ml/分の流速で通液した。そして、通液開始から約22分後又は約40分後に溶出したペプチド断片(以下、それぞれ「ペプチド断片C」又は「ペプチド断片D」と云う。)を含む画分を採取し、真空乾燥後、50%(v/v)水性アセトニトリルを含む0.1%(v/v)トリフルオロ酢酸に溶解した。以後、上記と同様に分析したところ、ペプチド断片C及びDは、配列表における配列番号11及び12に示すアミノ酸配列を有していることが判明した。

【0043】以上のような理化学的性質を有する酵素は未だ知られておらず、新規物質であると判断される。なお、リゾビウム・スピーシーズM-11は岡山県岡山市の土壤から分離され、平成4年12月24日以降、茨城県つくば市東1丁目1番3号にある通商産業省、工業技術院、生命工学工業技術研究所、特許微生物寄託センターに寄託番号『FERM BP-4130』で寄託されている。一方、アルスロバクター・スピーシーズQ36は岡山県総社市の土壤から分離されたものであり、平成5年6月3日以降、同センターに寄託番号『FERM BP-4316』で寄託されている。同じ出願人による特願平5-349216号明細書には、酵素の性質・性状とともに、両微生物の菌学的性質が詳細に開示されている。

【0044】そこで、本発明者が、実験例2-9で明らかにした酵素M-11の部分アミノ酸配列に基づき化学合成したオリゴヌクレオチドをプローブに使用し、リゾビウム・スピーシーズM-11の染色体DNAを鋭意検索した結果、配列表における配列番号3に示す塩基配列

を有する2, 316塩基対からなるDNA断片が得られた。そして、その塩基配列を解読したところ、酵素M-11は772個のアミノ酸からなる配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列を有していることが判明した。

【0045】一方、酵素Q36の部分アミノ酸配列に基づき化学合成したオリゴヌクレオチドをプローブにし、アルスロバクター・スピーシーズQ36の染色体DNAを同様に検索したところ、配列表における配列番号4に示す塩基配列を有する2, 325塩基対からなるDNA断片が得られた。この塩基配列を解読したところ、酵素Q36は775個のアミノ酸からなり、配列表における配列番号2に示すアミノ酸配列を有していることが判明した。

【0046】配列表における配列番号1乃至4に示す塩基配列及びアミノ酸配列を解明するに到った一連の工程を要約すると、次のようになる。

(1) 供与体微生物の培養物から当該酵素を分離し、高度に精製した。精製酵素をプロテアーゼにより部分加水分解後、加水分解物から2種類のペプチド断片を単離し、そのアミノ酸配列を決定した。

(2) 別途、供与体微生物の菌体より染色体DNAを分離し、精製後、制限酵素により部分的に切断して約3, 000乃至7, 000塩基対からなるDNA断片を採取した。DNAリガーゼにより、このDNA断片を予め制限酵素で切断しておいたプラスミドベクターに連結し、組換えDNAを作製した。

(3) 大腸菌に組換えDNAを導入して形質転換体を作製し、前記部分アミノ酸配列に基づき化学合成したオリゴヌクレオチドをプローブとするコロニーハイブリダイゼーションにより当該酵素をコードするDNAを含む形質転換体を選択した。

(4) 形質転換体から組換えDNAを採取し、プライマーとともにアニーリング後、DNAポリメラーゼを作用させてプライマーを伸長し、得られた相補鎖DNAをジデオキシ・チェーン・ターミネータ法により分析して塩基配列を決定した。そして、その塩基配列から推定されるアミノ酸配列と前記部分アミノ酸配列とを比較し、その塩基配列が当該酵素をコードしていることを確認した。

【0047】次の実験例3乃至6では、上記の工程

(2)乃至(4)を具体的に説明するが、これら実施例で用いる手法自体は斯界において公知のものであり、例えば、ジェー・サンプリック等『モレキュラー・クローニング・ア・ラボラトリー・マニュアル』、第2版、1989年、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス発行などにも詳述されている。

【0048】

【実験例3 リゾビウム・スピーシーズM-11に由来するDNAを含む組換えDNAと形質転換体の調製】

【0049】

【実験例3-1 染色体DNAの調製】リゾビウム・スピーシーズM-11をバクト・ニュートリエント・プロス培地(pH7.0)に植菌し、27℃で24時間回転振盪培養した。遠心分離により培養物から菌体を分離し、TES緩衝液(pH8.0)に浮遊させ、リゾチームを0.05%(w/v)加えた後、37℃で30分間インキュベートした。処理物を-80℃で1時間凍結後、TSS緩衝液(pH9.0)を加えて60℃に加温し、TES緩衝液/フェノール混液を加え、氷冷後、遠心分離により上清を採取した。この上清に2倍容の冷エタノールを加え、沈澱した粗染色体DNAを採取し、SSC緩衝液(pH7.1)に溶解後、リボヌクレアーゼとプロテアーゼをそれぞれ7.5μg又は125μg加え、37℃で1時間インキュベートして反応させた。その後、反応物にクロロフォルム/イソamilアルコール混液を加えて染色体DNAを抽出し、冷エタノールを加え、生成した染色体DNAを含む沈澱を採取した。このようにして得た精製染色体DNAを濃度約1mg/mlになるようにSSC緩衝液(pH7.1)に溶解し、溶液を-80℃で凍結した。

【0050】

【実験例3-2 組換えDNA pBMT7と形質転換体BMT7の調製】実験例3-1で得た精製染色体DNA溶液を約1mlとり、これに制限酵素Sau3AIを約35単位加え、37℃で約20分間反応させて染色体DNAを部分切断した後、蔗糖密度勾配超遠心法により約3, 000乃至7, 000塩基対からなるDNA断片を採取した。別途、プラスミドベクターBlue-script II SK(+)を1μgとり、常法により制限酵素BamHIを作用させて完全に切断した後、上記で得たDNA断片10μgとT4 DNAリガーゼを2単位加え、4℃で一晩静置することによりDNA断片をベクター断片に連結した。そして、得られた組換えDNAに東洋紡績製コンピテントセル『Epilurian Coli XL1-Blue』を30μl加え、氷冷下に30分間静置後、42℃に加温し、SOCブrossを加えて37℃で1時間インキュベートすることにより、組換えDNAを大腸菌に導入した。

【0051】次に、上記で得た形質転換体を5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-ガラクトシド50μg/mlを含む寒天平板培地(pH7.0)に植菌し、37℃で18時間培養後、培地上にナイロン膜を載置し、培地上に形成された約4, 400個のコロニーをナイロン膜に固定した。別途、常法により、配列表における配列番号9に示すアミノ酸配列における第17乃至21番目のPro-Glu-Trp-Glu-Lysで表される配列に基づき5'-CCNGARTGGGARAA-3'で表される塩基配列のプローブ1を化学合成し、同位体³²Pで標識後、前記ナイロン膜上に固定した

形質転換体のコロニーにハイブリダイズさせ、顕著な会合が認められた9種類の形質転換体を選択した。

【0052】常法により、これら9種類の形質転換体から組換えDNAを採取し、配列表における配列番号10に示すアミノ酸配列における第16乃至20番目のThr-Glu-Phe-Trp-Aspで表される配列に基づき化学合成した5'-ACNGARTTYTGGGA-3'で表される塩基配列のプロープ2をイー・エム・サザーン『ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー』、第98巻、第503~517頁(1975年)に記載されている方法に準じてハイブリダイズさせ、プロープ2と顕著な会合を示した組換えDNAを選択した。以上のようにして選択した組換えDNAと形質転換体を、それぞれ、『pBMT7』又は『BMT7』と命名した。

【0053】上記で得た形質転換体BMT7をアンピシリン100 μ g/mlを含むL-プロス培地(pH7.0)に植菌し、37℃で24時間回転振盪培養した。培養終了後、遠心分離により培養物から菌体を採取し、通常一般のアルカリ法により組換えDNAを菌体外に溶出させた。処理物を常法により精製し、分析したところ、組換えDNA pBMT7は約9,300塩基対からなり、図9に示す制限酵素地図で表される構造を有していた。図9に示すように、酵素M-11をコードする2,316塩基対からなるDNAは、制限酵素Pst Iによる切断部位付近の下流に位置していることが判明した。

【0054】

【実験例3-3 形質転換体による酵素の産生】マルトース2.0% (w/v)、ペプトン0.5% (w/v)、酵母エキス0.1% (w/v)、燐酸水素二ナトリウム0.1% (w/v)、燐酸二水素カリウム0.1% (w/v)を含む液体培地をpH7.0に調整し、アンピシリンを50 μ g/ml加え、120℃で20分間加熱滅菌し、冷却後、実験例3-2で得た形質転換体BMT7を植菌し、37℃で24時間回転振盪培養した。培養物を超音波処理して菌体を破碎し、遠心分離により不溶物を除去後、上清中の酵素活性を測定したところ、培養物11当たり換算して、約3,000単位の酵素が産生していた。

【0055】別途、対照として、大腸菌XLI-Blue株及びリゾビウム・スピーシーズM-11をアンピシリン無含有の同じ液体培地に植菌し、リゾビウム・スピーシーズM-11の場合、培養温度を30℃に設定した以外は上記と同様に培養・処理した。処理物の活性を測定したところ、リゾビウム・スピーシーズM-11による酵素の産生は培養物11当たり約1,500単位と、形質転換体BMT7と比較して有意に低いものであった。なお、宿主に使用した大腸菌XLI-Blue株は、当該酵素を全く産生しなかった。

【0056】その後、形質転換体BMT7が産生した酵素を実験例1-1と同様に精製し、その性質・性状を調べたところ、組換え型酵素はSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分子量値約76,000乃至87,000ダルトンを、また、等電点電気泳動で約3.6乃至4.6に等電点を示すなど、実験例2で得られた酵素M-11のものと同様の理化学的性質を有することが判明した。このことは、組換えDNA技術によっても当該酵素を製造でき、且つ、酵素の生産性も有意に向上することを示唆している。

【0057】【実験例4 リゾビウム・スピーシーズM-11に由来する相補鎖DNAの調製とその塩基配列、アミノ酸配列の決定】実験例3-2で得た組換えDNA pBMT7を、常法に従って、各種制限酵素で分解し、Bluescript II SK(+)にサブクローニングして、塩基配列決定用DNAとした。これら塩基配列決定用DNAを2 μ gとり、これに2M水酸化ナトリウム水溶液を加えて変性させた後、適量の冷エタノールを加え、生成したテンプレートDNAを含む沈澱を採取し、真空乾燥した。このテンプレートDNAに化学合成した5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'で表される塩基配列のプライマー1を50pmol/mlと、20mM塩化マグネシウムと50mM塩化ナトリウムを含む40mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)を10 μ l加え、65℃で2分間インキュベートしてアニリングした後、dATP、dGTP及びdTTPをそれぞれ7.5 μ M含む水溶液を2 μ lと、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP (2mCi/ml)を0.5 μ lと、0.1Mジチオスレイトールを1 μ lと、1.5単位/mlのT7 DNAポリメラーゼを2 μ l加え、25℃で5分間インキュベートすることによりプライマー1を5'末端から3'末端に向かって伸長させ、相補鎖DNAを生成させた。

【0058】次に、上記で得た相補鎖DNAを含む反応物を四等分し、それぞれにddATP、ddCTP、ddGTP及びddTTPのいずれかを8 μ Mと80 μ M dNTPを含む50mM塩化ナトリウム水溶液を2.5 μ l加え、37℃で5分間インキュベートして反応させ、20mM EDTA、0.05% (w/v) ブロムフェノールブルー及び0.05% (w/v) キシレンシアノールを含む95% (v/v) 水性ホルムアミド溶液を4 μ l加えて反応を停止させた。反応物を沸騰水浴中で3分間加熱後、6% (w/v) ポリアクリルアミドゲル上にとり、約2,000Vの定電圧を印加しながら電気泳動してDNA断片を分離し、次いで、常法によりゲルを固定し、乾燥させた後、オートラジオグラフィーした。

【0059】ラジオグラム上に分離したDNA断片を解析した結果、相補鎖DNAは配列表における配列番号5に示す2,936塩基対からなる塩基配列を含んでいる

ことが判明した。この塩基配列から推定されるアミノ酸配列は配列表における配列番号5に併記したとおりであり、このアミノ酸配列と配列表における配列番号7、9又は10に示す酵素M-11のN末端アミノ酸配列、部分アミノ酸配列を比較したところ、配列番号7のN末端アミノ酸配列は配列表における配列番号5における第1乃至20番目の配列に、また、配列番号9又は10の部分アミノ酸配列は配列表における配列番号5における第486乃至506番目又は第606乃至626番目の配列に一致した。これは、酵素M-11が配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列を有するものであり、リゾビウム・スピーシーズM-11においては、酵素M-11が配列表における配列番号3に示す塩基配列のDNAによりコードされていることを示している。

【0060】【実験例5 アルスロバクター・スピーシーズQ36に由来するDNAを含む組換えDNAと形質転換体の調製】

【0061】

【実験例5-1 染色体DNAの調製】実験例3-1と同様にしてアルスロバクター・スピーシーズQ36から染色体DNAを分離・精製し、濃度約1mg/mlになるようにSSC緩衝液(pH7.1)に溶解し、-80℃で凍結した。

【0062】

【実験例5-2 組換えDNA pBQT13と形質転換体BQT13の調製】実験例5-1で得た精製染色体DNA溶液を実験例3-2と同様に部分切断した後、蔗糖密度勾配超遠心法により約3,000乃至6,000塩基対からなるDNA断片を採取した。その後、T4 DNAリガーゼを使用し、このDNA断片を実験例3-2と同様に制限酵素Bam HIによるベクターBlue script II SK(+)の消化物に連結し、得られた組換えDNAを大腸菌XL I-Blue株に導入した。得られた形質転換体を実験例3-2と同様に5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-ガラクトシドを含む寒天平板培地で培養し、生成した約4,500個のコロニーをナイロン膜上に固定する一方、配列表における配列番号12に示すアミノ酸配列における第11乃至16番目のPhe-Asp-Val-Asp-Trp-Aspで表される配列に基づき5'-TTYGAYGTNGAYTGGGA-3'で表される塩基配列のプローブ3を化学合成し、同位体³²Pで標識後、前記ナイロン膜上に固定した形質転換体のコロニーにハイブリダイズさせ、顕著な会合が認められた8種類の形質転換体を選択した。

【0063】実験例3-2と同様にして、これら8種類の形質転換体から組換えDNAを採取し、配列表における配列番号11に示すアミノ酸配列における第16乃至20番目のThr-Glu-Phe-Trp-Aspで表される配列に基づき化学合成した5'-ACNGAR

TTYTGGGA-3'で表される塩基配列のプローブ4をハイブリダイズさせ、顕著な会合を示した組換えDNAを選択した。以上のようにして選択した組換えDNAと形質転換体を、それぞれ、『pBQT13』又は『BQT13』と命名した。

【0064】その後、この形質転換体BQT13をアンピシリンを含むL-ブロス培地で実験例3-2と同様に培養し、培養物より採取した菌体から組換えDNAを溶出させ、精製し、分析したところ、組換えDNA pBQT13は約7,200塩基対からなり、図10に示す制限酵素地図で表される構造を有していた。図10に示すように、酵素Q36をコードする2,325塩基対からなるDNAは、制限酵素Xmn Iによる切断部位付近の下流に位置していることが判明した。

【0065】

【実験例5-3 形質転換体BQT13による酵素の産生】マルトース2.0%(w/v)、ペプトン0.5%(w/v)、酵母エキス0.1%(w/v)、磷酸水素二ナトリウム0.1%(w/v)、磷酸二水素カリウム0.1%(w/v)を含む液体培地をpH7.0に調整し、アンピシリンを50μg/ml加え、120℃で20分間加熱滅菌し、冷却後、実験例5-2で得た形質転換体BQT13を植菌し、37℃で24時間回転振盪培養した。培養物を超音波処理して菌体を破碎し、遠心分離により不溶物を除去後、上清中の酵素活性を測定したところ、培養物1l当たり換算して、約2,450単位の酵素が産生していた。

【0066】別途、対照として、大腸菌XL I-Blue株及びアルスロバクター・スピーシーズQ36をアンピシリン無含有の同じ組成の液体培地に植菌し、アルスロバクター・スピーシーズQ36の場合、培養温度を30℃に設定した以外は上記と同様に培養・処理した。処理物の活性を測定したところ、アルスロバクター・スピーシーズQ36による酵素の産生は培養物1l当たり約1,200単位と、形質転換体BQT13と比較して有意に低いものであった。なお、宿主に使用した大腸菌XL I-Blue株は、当該酵素を産生しなかった。

【0067】その後、形質転換体BQT13が産生した酵素を実験例1-1と同様に精製し、その性質・性状を調べたところ、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分子量約76,000乃至87,000ダルトンを、また、等電点電気泳動で約3.6乃至4.6に等電点を示すなど、実験例2で得られた酵素Q36のものと同様の理化学的性質を有することが判明した。このことは、組換えDNA技術によっても当該酵素を製造でき、且つ、酵素の生産性も有意に向上することを示唆している。

【0068】【実験例6 アルスロバクター・スピーシーズQ36に由来する相補鎖DNAの調製とその塩基配列、アミノ酸配列の決定】実験例5-2で得た組換えD

NA pBQT13を実験例4と同様に処理してテンプレートDNAとし、これをプライマー1とともにアニーリング後、T7 DNAポリメラーゼを作用させてプライマー1を5'末端から3'末端に向かって伸長させ、相補鎖DNAを生成させた。実験例4と同様に、この相補鎖DNAにジデオキシ・チェーン・ターミネータ法を適用し、ラジオグラム上に分離したDNA断片を解析した結果、相補鎖DNAは配列表における配列番号6に示す3, 073塩基対からなる塩基配列を含んでいることが判明した。この塩基配列から推定されるアミノ酸配列は配列表における配列番号6に併記したとおりであり、このアミノ酸配列と配列表における配列番号8、11又は12に示すN末端アミノ酸配列、部分アミノ酸配列を比較したところ、配列番号8のN末端アミノ酸配列は配列表における配列番号6における第1乃至20番目の配列に、また、配列番号11又は12の部分アミノ酸配列は配列表における配列番号6における第606乃至625番目又は第110乃至129番目の配列に一致した。これは、酵素Q36が配列表における配列番号2に示すアミノ酸配列を有するものであり、アルスロバクター・スピーシーズQ36においては、酵素Q36が配列表における配列番号4に示す塩基配列のDNAによりコードされていることを示している。

【0069】以上説明したように、グルコース重合度3以上の還元性澱粉糖から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する酵素は、本発明者が長年に亘る研究の一成果として見出されたものであり、従来公知の酵素には見られない独特の理化学的性質を具備している。この発明は、組換えDNA技術を応用することにより、この酵素を創製しようというものである。以下、実施例等を参照しながら、この発明の組換え型酵素とその製造方法並びに用途につき、具体的に説明する。

【0070】この発明でいう組換え型酵素とは、組換えDNA技術により創製され、グルコース重合度3以上の還元性澱粉糖から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する酵素全般を意味する。この発明の組換え型酵素は、通常、解明されたアミノ酸配列を有しており、その一例として、例えば、配列表における配列番号1又は2に示すアミノ酸配列かそれに相同的なアミノ酸配列が挙げられる。配列表における配列番号1又は2のアミノ酸配列に相同的なアミノ酸配列を有する変異体は、所期の酵素作用を実質的に変えることなく、配列表における配列番号1又は2に示すアミノ酸配列における構成アミノ酸の1個又は2個以上を他のアミノ酸で置換することにより得ることができる。なお、同じDNAであっても、それを導入する宿主や、そのDNAを含む形質転換体の培養に使用する栄養培地の成分・組成、培養温度・pHなどに依っては、宿主内酵素によるDNA発現後の修飾などにより、所期の酵素反応は保持しているものの、配列表における配列番号1又は2に示すアミノ

酸配列におけるN末端付近のアミノ酸が1個又は2個以上欠失したり、N末端に1個又は2個以上のアミノ酸が新たに付加した変異体の產生することがある。斯かる変異体も、それがグルコース重合度3以上の還元性澱粉糖から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成するかぎり、当然、この発明の組換え型酵素に包含される。

【0071】この発明による組換え型酵素は、特定のDNAを含む形質転換体の培養物から採取することができる。この発明で使用する形質転換体は、例えば、配列表における配列番号3又は4に示す塩基配列かそれに相同的な塩基配列又はそれらに相補的な塩基配列のDNAを適宜宿主に導入することにより得ることができる。なお、上記塩基配列は、遺伝子コードの縮重を利用して、コードするアミノ酸配列を変えことなく、塩基の1個又は2個以上を他の塩基で置き換えてもよい。また、DNAが宿主中で実際に当該酵素の産生を発現するために、当該酵素又はその相同変異体をコードする塩基配列における塩基の1個又は2個以上を他の塩基で適宜置換し得ることはいうまでもない。

【0072】この発明で使用するDNAは、それが前述のような配列を有するかぎり、それが天然に由来するものか人為的に合成されたものであるかは問わない。天然の給源としては、例えば、リゾビウム・スピーシーズM-11 (FERM BP-4130)、アルスロバクター・スピーシーズQ36 (FERM BP-4316)、ブレバクテリウム・ヘロボルム (ATCC 11822)、フラボバクテリウム・アクアチレ (IFO 3772)、マイクロコッカス・ルテウス (IFO 3064)、マイクロコッカス・ロゼウス (ATCC 186)、クルトバクテリウム・シトレウム (IFO 15231)、マイコバクテリウム・スメグマチス (ATCC 19420) 及びテラバクター・ツメスセンス (IFO 12960) を含むリゾビウム属、アルスロバクター属、ブレバクテリウム属、フラボバクテリウム属、マイクロコッカス属、クルトバクテリウム属、マイコバクテリウム属、テラバクター属の微生物が挙げられ、これら微生物の菌体からはこの発明のDNAを含む遺伝子が得られる。すなわち、斯かる微生物を栄養培地に植菌し、好気的条件下で約1乃至3日間培養後、培養物から菌体を取り出し、リゾチームやβ-グルカナーゼなどの細胞壁溶解酵素や超音波で処理することにより、当該DNAを含む遺伝子を菌体外に溶出させる。このとき、細胞壁溶解酵素にプロテアーゼなどの蛋白質加水分解酵素を併用したり、菌体を超音波処理する際、SDSなどの界面活性剤を共存させたり凍結融解してもよい。斯くして得られる処理物に、例えば、フェノール抽出、アルコール沈殿、遠心分離、プロテアーゼ処理、リボヌクレアーゼ処理などの斯界における通常一般の方法を適用すれば目的のDNAが得られる。一方、DNAを人為的に合成するに

は、例えば、配列表における配列番号 3 又は 4 に示す塩基配列に基づいて化学合成するか、配列表における配列番号 1 又は 2 に示すアミノ酸配列をコードする DNA を自律複製可能な適宜ベクターに挿入して組換え DNA とし、これを適宜宿主に導入して得られる形質転換体を培養し、培養物から菌体を分離し、その菌体から当該 DNA を含むプラスミドを採取すればよい。

【0073】斯かる DNA は、通常、組換え DNA の形態で宿主に導入される。組換え DNA は、通常、DNA と自律複製可能なベクターを含んでなり、DNA が入手できれば、通常一般の組換え DNA 技術により比較的容易に調製することができる。斯かるベクターの例としては、pBR322、pUC18、Bluescript I I SK (+)、pUB110、pTZ4、pC194、pHV14、TRp7、YEp7、pBS7 などのプラスミドベクターや λ gt \cdot λ C、 λ gt \cdot λ B、 ρ 11、 ϕ 1、 ϕ 105 などのファージベクターが挙げられ、このうち、この発明の DNA を大腸菌で発現させるには pBR322、pUC18、Bluescript I I SK (+)、 λ gt \cdot λ C 及び λ gt \cdot λ B が好適であり、一方、枯草菌で発現させるには pUB110、pTZ4、pC194、 ρ 11、 ϕ 1 及び ϕ 105 が好適である。pHV14、TRp7、YEp7 及び pBS7 は、組換え DNA を 2 種以上の宿主内で増殖させる場合に有用である。

【0074】DNA を斯かるベクターに挿入するには、斯界において通常一般の方法が採用される。具体的には、先ず、DNA を含む遺伝子と自律複製可能なベクターとを制限酵素及び／又は超音波により切断し、次に、生成した DNA 断片とベクター断片とを連結する。遺伝子及びベクターの切断にヌクレオチドに特異的に作用する制限酵素、とりわけ、I I 型の制限酵素、詳細には、Sau 3AI、EcoRI、Hind III、Bam HI、Sal I、Xba I、Sac I、Pst I などを使用すれば、DNA 断片とベクター断片を連結するのが容易となる。DNA 断片とベクター断片を連結するには、必要に応じて、両者をアニーリングした後、生体内又は生体外で DNA リガーゼを作用させればよい。斯くして得られる組換え DNA は、適宜宿主に導入して形質転換体とし、これを培養することにより無限に複製可能である。

【0075】このようにして得られる組換え DNA は、大腸菌、枯草菌、放線菌、酵母を始めとする適宜の宿主微生物に導入することができる。宿主が大腸菌の場合には、宿主を組換え DNA とカルシウムイオンの存在下で培養すればよく、一方、宿主が枯草菌の場合には、コンピテントセル法やプロトプラスト法を適用すればよい。形質転換体をクローニングするには、コロニーハイブリダイゼーション法を適用するか、グルコース重合度 3 以上の還元性澱粉糖を含む培養培地で培養し、該澱粉糖よ

り末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成するものを選択すればよい。

【0076】斯くして得られる形質転換体は、培養培地で培養すると、菌体内外に当該酵素を産生する。培養培地には、通常、炭素源、窒素源、ミネラル、さらには、必要に応じて、アミノ酸やビタミンなどの微量栄養素を補足した通常一般の液体培地が使用され、個々の炭素源としては、例えば、澱粉、澱粉加水分解物、グルコース、果糖、蔗糖などの糖質が、また、窒素源としては、例えば、アンモニア若しくはアンモニウム塩、尿素、硝酸塩、ペプトン、酵母エキス、脱脂大豆、コーンステアープリカー、肉エキスなどの含窒素無機乃至有機物が挙げられる。形質転換体を斯かる培養培地に植菌し、培養培地を温度 25 乃至 65℃、pH 2 乃至 8 に保ちつつ、通気攪拌などによる好氣的条件下で約 1 乃至 6 日間培養すれば、当該酵素を含む培養物が得られる。この培養物は酵素剤としてそのまま使用可能ではあるが、通常は使用に先立ち、必要に応じて、超音波や細胞壁溶解酵素により菌体を破碎した後、濾過、遠心分離などにより酵素を菌体又は菌体破碎物から分離し、精製する。精製には酵素を精製するための通常一般の方法が採用でき、例えば、菌体又は菌体破碎物を除去した培養物に濃縮、塩析、透析、分別沈澱、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲル電気泳動、等電点電気泳動などの 1 種若しくは 2 種以上を適宜組合せて適用すればよい。

【0077】前述のとおり、この発明による組換え型酵素は、グルコース重合度 3 以上の還元性澱粉糖から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成するという、従来の酵素に見られない顕著な性質を有する。生成した非還元性糖質は温和で上品な甘味に加えて適度の粘度と保湿性を有し、そして、何よりも、分子中に還元性を有しないので、着色や変質の懸念なく飲食物を甘味付けできるという大きな利点がある。当該組換え型酵素のこの性質を利用することにより、従来、還元性故に敬遠されがちであった種々の澱粉糖を、還元性を有しないか還元性が顕著に低下した、扱い易い、有用な糖質に変換できることとなる。

【0078】斯かる変換方法につきさらに説明すると、この発明による組換え型酵素の基質には、通常、澱粉、又はアミロペクチン、アミロースなどの澱粉質を酸及び／又はアミラーゼによって部分的に加水分解して得られる還元性澱粉加水分解物が用いられる。斯かる澱粉加水分解物は斯界における通常一般の方法により得ことができ、通常、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース、マルトヘプタオースなどのグルコース重合度 3 以上のマルトオリゴ糖の 1 種若しくは 2 種以上を含んでなる。アミラーゼ研究会編『ハンドブック・オブ・アミレーシズ・アンド

・リレイテッド・エンザイムズ』、1988年、パーガモン・プレス発行に記載されている α -アミラーゼ、マルトテトラオース生成アミラーゼ、マルトペンタオース生成アミラーゼ及びマルトヘキサオース生成アミラーゼは、この発明で使用する還元性澱粉糖の調製に特に有用であり、これらアミラーゼのいずれかを使用することにより、グルコース重合度3以上の還元性澱粉糖を豊富に含む澱粉糖混合物が容易且つ効率的に得られる。なお、このとき、必要に応じて、ブルラナーゼやイソアミラーゼなどの澱粉枝切酵素を併用すれば、当該組換え型酵素の基質となり得る還元性澱粉糖の収量を上げることができる。

【0079】この発明による変換方法においては、通常、基質として上記したような還元性澱粉糖の1種又は2種以上を含む水溶液にこの発明による組換え型酵素を共存せしめ、水溶液を所定の温度、pHに保ちつつ、所望量の非還元性糖質が生成するまで反応させる。反応は0.1% (w/w) 程度の基質濃度下でも進行するが、この発明による変換方法を大規模に実施する場合には、より高濃度の2% (w/w) 以上、望ましくは、5乃至50% (w/w) とするのがよい。反応時の温度とpHは組換え型酵素が失活することなく基質に効率的に作用するレベルに設定され、温度は55℃付近まで、望ましくは、約40乃至55℃に、また、pHは5乃至10、望ましくは、約6乃至8の範囲に設定される。組換え型酵素の量と反応時間は、反応の進行具合に依って適宜に設定する。斯かる反応によりグルコース重合度3以上の還元性澱粉糖の還元力は顕著に低下し、マルトペンタオースの場合、還元力はもとの約7%程度にまで低下する。

【0080】この発明の変換方法により得られた反応物はそのまま使用可能であるが、通常、使用に先立ち精製する。すなわち、濾過・遠心分離などにより反応物から不溶物を除去し、活性炭により脱色した後、イオン交換樹脂により脱塩・精製し、濃縮してシロップ状物とする。用途に依っては、このシロップ状物を真空乾燥、噴霧乾燥などにより固状物としてもよい。実質的に非還元性糖質のみからなる製品を得るには、上記シロップ状物にイオン交換樹脂、活性炭、シリカゲルなどによる糖質を分離するための種々のクロマトグラフィー、アルコール、アセトンなどによる分別沈澱、膜濾過、酵母による発酵、アルカリによる還元性糖質の分解除去などの1種若しくは2種以上を適用する。大量の反応物を処理するには、例えば、特開昭58-23799号公報や特開昭58-72598号公報に開示されている強酸性カチオン交換樹脂を使用する固定床方式、移動床方式又は擬似移動床方式のイオン交換クロマトグラフィーが有用であり、これらの方法によるときは、非還元性糖質の含量が高い製品を大量且つ効率的に得ることができる。

【0081】斯くして得られる非還元性糖質は、糖質甘

味剤の還元性を嫌う種々の物品に広範な用途を有し、例えば、食品、化粧品、医薬品の甘味剤、呈味改善剤、品質改善剤、安定剤、賦形剤として極めて有用である。加えて、当該非還元性糖質は、グルコアミラーゼ、 α -グルコシダーゼ、あるいは、特願平5-340343号明細書に開示されているトレハロース遊離酵素を作用させると、ほぼ定量的にトレハロースを与えることから、従来、大量入手が難しかったトレハロースを製造するための中間体としても有用である。

【0082】以下、2~3の実施例により、この発明による組換え型酵素の製造方法と還元性澱粉糖の変換方法を具体的に説明する。

【0083】

【実施例A-1 組換え型酵素の製造】500ml 容三角フラスコにマルトース2.0% (w/v)、ペプトン0.5% (w/v)、酵母エキス0.1% (w/v)、燐酸水素二ナトリウム0.1% (w/v)、燐酸二水素カリウム0.1% (w/v)を含む液体培地 (pH7.0)を100mlずつとり、アンピシリンを50 μ g/ml加えた後、120℃で20分間オートクレーブして加熱滅菌した。冷却後、三角フラスコ内の液体培地に実験例3-2の方法で得た形質転換体BMT7を植菌し、回転振盪下、27℃で24時間種培養した。別途、上記と同組成の液体培地を18lとり、アンピシリンを50 μ g/ml加え、120℃で20分間加熱滅菌し、冷却後、上記で得た種培養液を1% (v/v) 接種し、37℃で24時間通気攪拌培養した。培養物を超音波処理して菌体を破碎し、遠心分離により不溶物を除去後、上清中の酵素活性を測定したところ、培養物1lあたりに換算して、約3,000単位の酵素が産生していた。この上清を実験例1-1の方法により精製したところ、比活性約200単位/mg蛋白質の組換え型酵素を1ml当たり約135単位含む水溶液が約50ml得られた。

【0084】

【実施例A-2 組換え型酵素の製造】実験例5-2の方法により得た形質転換体BQT13を実施例A-1と同様に培養し、培養物を超音波処理して菌体を破碎し、遠心分離により不溶物を除去後、上清中の酵素活性を測定したところ、培養物1lあたりに換算して、約2,450単位の酵素が産生していた。この上清を実施例1-1の方法により精製したところ、比活性約200単位/mg蛋白質の組換え型酵素を1ml当たり約120単位含む水溶液が約45ml得られた。

【0085】

【実施例B-1 組換え型酵素による澱粉加水分解物の変換】馬鈴薯澱粉を濃度6% (w/w) になるよう水中に懸濁し、120℃で10分間オートクレーブして糊化した。糊化液を50℃に急冷し、pHを約4.5に調整後、林原生物化学研究所製イソアミラーゼ剤を澱粉固形分1g当たり2,500単位加え、50℃で20時間反

応させた。反応物をpH6.0に調整し、120℃で10分間オートクレーブして酵素を失活させた後、45℃に急冷し、ノボ・ノルディスク・インダストリー製 α -アミラーゼ剤『ターマミル60L』を澱粉固形分1g当たり150単位加え、45℃で24時間反応させてマルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオースなどのグルコース重合度3以上の還元性澱粉糖を含む反応物を得た。この反応物を120℃で20分間オートクレーブして酵素を失活させ、45℃まで急冷後、実施例A-1で得た組換え型酵素を澱粉糖固形分1g当たり1単位加え、45℃で96時間反応させた。反応物を96℃で10分間加熱して酵素を失活させ、冷却し、濾過後、常法にしたがって濾液を活性炭により脱色し、イオン交換樹脂により脱塩・精製し、濃縮して濃度約70% (w/w) のシロップ状物を澱粉固形分当たり約91%の収率で得た。

【0086】実験例2-1の方法によりこのシロップ状物を分析したところ、DE値は18.7、主成分として、固形分当たり α -グルコシルトレハロースを8.4%、 α -マルトシルトレハロースを5.6%、 α -マルトトリオシルトレハロースを37.9%含み、前記還元性糖質の殆どが対応する非還元性糖質に変換されていた。温和で上品な甘味に加えて適度の粘性と保湿性を有する本品は、食品、化粧品、医薬品の甘味剤、呈味改善剤、品質改善剤、安定剤、賦形剤として有用である。また、本品は非還元性糖質の含量が高いので、トレハロースを製造するための中間体としても有用である。

【0087】

【実施例B-2-組換え型酵素による澱粉加水分解物の変換】トウモロコシ澱粉を33% (w/w) になるよう水中に懸濁し、炭酸カルシウムを0.1% (w/w) 加えた。懸濁液にノボ・ノルディスク・インダストリー製 α -アミラーゼ剤『ターマミル60L』を澱粉固形分当たり0.2%加え、95℃で15分間反応させて澱粉を液化した。液化物を120℃で10分間オートクレーブして酵素を失活させ、55℃に急冷後、特開昭63-240784号公報に開示されているシュドモナス・スツツェリ由来のマルトテトラオース生成アミラーゼを澱粉固形分1g当たり5単位加え、55℃で6時間反応させた。その後、反応物に上田化学製 α -アミラーゼ剤『 α -アミラーゼ2A』を澱粉固形分1g当たり30単位加え、65℃で4時間反応させてマルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオースなどのグルコース重合度3以上の還元性澱粉糖を固形分当たり約50%含む反応物を得た。この反応物を120℃で10分間オートクレーブして酵素を失活させ、45℃に急冷後、pH6.5に調整し、実施例A-1の方法で得た組換え型酵素を澱粉糖固形分1g当たり2単位加え、45℃で64時間反応させた。反応物を95℃で10分間加熱して酵素を失活させ、冷却し、濾過後、常法にしたがって

活性炭により脱色し、イオン交換樹脂により脱塩・精製し、濃縮して濃度約70% (w/w) のシロップ状物を澱粉固形分当たり約90%の収率で得た。

【0088】実験例2-1の方法によりこのシロップ状物を分析したところ、DE値は10.5、主成分として、固形分当たり α -グルコシルトレハロースを3.8%、 α -マルトシルトレハロースを43.8%、 α -マルトリオシルトレハロースを1.2%含み、前記還元性澱粉糖の殆どが対応する非還元性糖質に変換されていた。温和で上品な甘味に加えて適度の粘性と保湿性を有する本品は、食品、化粧品、医薬品の甘味剤、呈味改善剤、品質改善剤、安定剤、賦形剤として有用である。また、本品は非還元性糖質の含量が高いので、トレハロースを製造するための中間体としても有用である。

【0089】

【実施例B-3 組換え型酵素によるマルトペンタオースの変換】林原生物化学研究所製高純度マルトペンタオースを20% (w/w) になるよう水中に溶解し、pH6.5に調整後、実施例A-1の方法で得た組換え型酵素をマルトペンタオース1g当たり1単位加え、45℃で48時間反応させた。反応物を95℃で10分間加熱して酵素を失活させ、冷却し、濾過し、濃縮後、実験例2-1の方法により分析したところ、マルトペンタオースの約92%が α -マルトトリオシルトレハロースに変換されていた。

【0090】別途、内径5.4cm、長さ5mのジャケット付きステンレス製カラム4本に東京有機化学工業製強酸性カチオン交換樹脂『XT-1016 (Na型)』を均一に充填し、カラムを直列に連結して全長を20mとした。カラム内温度を55℃に保ちつつ上記反応物を樹脂に対して約5% (v/v) の割合で負荷し、次いで、カラムに55℃の温水をSV0.13の流速で通液して糖質成分を溶出させた。溶出液の糖組成を分析し、当該非還元性糖質の含量が高い画分を採取し、これを濃縮し、真空乾燥し、破碎して固状物を固形分当たり約55%の収率で得た。

【0091】実験例2-1の方法により分析したところ、この固状物のDE値は約0.2未満であり、固形分当たり α -マルトトリオシルトレハロースを99.0%含んでいた。吸湿性低く、極めて低い還元性とかすかな甘味を有する本品は、食品、化粧品、医薬品の甘味剤、呈味改善剤、品質改善剤、安定剤、賦形剤として有用である。また、本品は非還元性糖質の含量が高いので、トレハロースを製造するための中間体としても有用である。

【0092】

【実施例B-4 組換え型酵素による澱粉加水分解物の変換】松谷化学工業製澱粉加水分解物『バインデックス#4』を40% (w/w) となるよう水中に溶解し、溶液を45℃、pH6.5に調整後、実施例A-1の方法

で得た組換え型酵素を澱粉加水分解物 1 g 当たり 1 単位加えて 9 6 時間反応させ、末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を含む反応物を得た。次いで、この反応物を 1 0 0 °C で 1 0 分間加熱して酵素を失活させ、濃度約 2 0 % (w/w) まで濃縮し、5 5 °C に冷却後、pH 4. 5 に調整してナガセ生化学工業製グルコアミラーゼ剤『グルコチーム』を糖質固形分 1 g 当たり 1 0 単位加え、4 0 時間反応させた。反応物を 1 0 0 °C で 1 0 分間加熱して酵素を失活させ、冷却し、濾過後、常法にしたがって活性炭により脱色し、イオン交換樹脂により脱塩・精製し、濃縮してトレハロースを固形分当たり約 2 9. 7 % 含む濃度約 6 0 % (w/w) のシロップ状物を得た。

【0 0 9 3】このシロップ状物を強酸性カチオン交換樹脂としてオルガノ製『CG 6 0 0 0 (Na⁺型)』を使用した以外実施例 B-3 と同様に分画し、トレハロースを固形分当たり約 9 0 % 含む画分を採取した。この画分を濃度約 7 5 % (w/w) に濃縮後、助晶罐にとり、種晶としてトレハロース含水結晶を糖質固形分当たり約 2 % 加え、緩やかに攪拌しながら助晶して結晶化度約 4 5 % のマスキットを得た。このマスキットを約 1 5 0 k g / c m² の圧力下、噴霧乾燥塔の上部に設けた噴霧ノズルより噴霧乾燥塔下方に向かって噴霧する一方、約 8 5 °C の温風を噴霧乾燥塔の上部から下方に向かって送風しつつ、噴霧乾燥塔の底部に設けたベルトコンベア上に蓄積した結晶性粉状物を噴霧乾燥塔外に徐々に搬出した。その後、粉状物を熟成塔に移し、約 4 0 °C の温風を送風しながら 1 0 時間熟成して結晶化と乾燥を完了した。

【0 0 9 4】吸湿性なく、温和で上品な甘味を有する本品は、食品、化粧品、医薬品、飼料の甘味剤、呈味改善剤、品質改善剤、安定剤、賦形剤として有用である。

【0 0 9 5】

【実施例 B-5 組換え型酵素による澱粉加水分解物の変換】タピオカ澱粉を 3 4 % (w/w) になるように水中に懸濁し、炭酸カルシウムを 0. 1 % (w/w) 加えた。懸濁液にノボ・ノルディスク・インダストリー製 α -アミラーゼ剤『ターマミル 6 0 L』を澱粉固形分当たり 0. 2 % 加え、9 5 °C で 1 5 分間反応させて澱粉を液化した。液化物を 1 2 0 °C で 1 0 分間オートクレーブして酵素を失活させ、5 5 °C に急冷し、pH 5. 2 に調整後、上田化学製 α -アミラーゼ剤『 α -アミラーゼ 2 A』と林原生物化学研究所製イソアミラーゼ剤を澱粉固形分 1 g 当たりそれぞれ 1 0 単位又は 5 0 0 単位加え、5 5 °C で 2 0 時間反応させてマルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオースなどのグルコース重合度 3 以上の還元性澱粉糖を固形分当たり約 6 0 % 含む DE 約 2 9 の反応物を得た。この反応物を 1 2 0 °C で 1 0 分間オートクレーブして酵素を失活させ、4 5 °C に急冷し、pH 6. 5 に調整後、実施例 A-2 の方法で得た組換え型酵素を澱粉糖固形分 1 g

当たり 2 単位加え、4 5 °C で 6 4 時間反応させた。反応物を 9 5 °C で 1 0 分間加熱して酵素を失活させ、冷却し、濾過後、常法にしたがって活性炭により脱色し、イオン交換樹脂により脱塩・精製し、濃縮して濃度約 7 0 % (w/w) のシロップ状物を澱粉固形分当たり約 9 0 % の収量で得た。

【0 0 9 6】実験例 2-1 の方法によりこのシロップ状物を分析したところ、DE 値は 1 5. 8、主成分として、固形分当たり α -グルコシルトレハロースを 5. 8 %、 α -マルトシルトレハロースを 8. 5 %、 α -マルトトリオシルトレハロースを 1 3. 1 %、 α -マルトテトラオシルトレハロースを 1 8. 9 %、 α -マルトペンタオシルトレハロースを 3. 6 % 含む、前記還元性澱粉糖の殆どが対応する非還元性糖質に変換されていた。温和で上品な甘味に加えて適度の粘性と保湿性を有する本品は、食品、化粧品、医薬品の甘味剤、呈味改善剤、品質改善剤、安定剤、賦形剤として有用である。本品は非還元性糖質の含量が高いので、トレハロースを製造するための中間体としても有用である。

【0 0 9 7】

【実施例 B-6 組換え型酵素による澱粉加水分解部の変換】実施例 B-2 と同様に液化トウモロコシ澱粉にマルトテトラオース生成アミラーゼと α -アミラーゼを逐次反応させ、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオースなどのグルコース重合度 3 以上の還元性澱粉糖を固形分当たり約 5 0 % 含む反応物を得た。この反応物を 1 2 0 °C で 1 0 分間オートクレーブして酵素を失活させ、4 5 °C に急冷後、pH 6. 5 に調整し、実施例 A-2 の方法で得た組換え型酵素を澱粉糖固形分 1 g 当たり 2 単位加え、4 5 °C で 6 4 時間反応させた。反応物を 9 5 °C で 1 0 分間加熱して酵素を失活させ、冷却し、濾過後、常法にしたがって活性炭により脱色し、イオン交換樹脂により脱塩・精製し、濃縮して濃度約 7 0 % (w/w) のシロップ状物を澱粉固形分当たり約 9 0 % の収量で得た。

【0 0 9 8】実験例 2-1 の方法によりこのシロップ状物を分析したところ、DE 値は 1 0. 3、主成分として、固形分当たり α -グルコシルトレハロースを 3. 6 %、 α -マルトシルトレハロースを 4 4. 0 %、 α -マルトトリオシルトレハロースを 1. 0 % 含む、前記還元性澱粉糖の殆どが対応する非還元性糖質に変換されていた。温和で上品な甘味に加えて適度の粘性と保湿性を有する本品は、食品、化粧品、医薬品の甘味剤、呈味改善剤、品質改善剤、安定剤、賦形剤として有用である。また、本品は非還元性糖質の含量が高いので、トレハロースを製造するための中間体としても有用である。

【0 0 9 9】

【発明の効果】以上説明したように、この発明は、グルコース重合度 3 以上の還元性澱粉糖から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する、従来未知の

全く新規な酵素の発見に基づくものである。この発明は、組換えDNA技術により斯かる酵素を大規模且つ効率的に生産する道を拓くものである。この発明による組換え型酵素を使用する変換方法により、還元性澱粉糖は効率的に対応する非還元性糖質に変換され、その生成した非還元性糖質は温和で上品な甘味に加えて適度の粘性と保湿性を有し、しかも、分子中に還元性を有しないので、着色や変質の懸念なく飲食物を甘味付けできる実益がある。加えて、この発明による組換え型酵素は全アミノ酸配列までが明らかにされた酵素であり、飲食物等への配合使用を前提とするトレハロースや末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質の製造に安心して使用

し得るものである。

【0100】この発明は斯くも顕著な作用効果を奏する意義のある発明であり、斯界に貢献すること誠に多大な発明であると言える。

【0101】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：772

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ポリペプチド

配列

```

Met Arg Thr Pro Ala Ser Thr Tyr Arg Leu Gln Ile Arg Arg Gly Phe Thr
1           5           10           15
Leu Phe Asp Ala Ala Glu Thr Val Pro Tyr Leu Lys Ser Leu Gly Val Asp
      20           25           30
Trp Ile Tyr Leu Ser Pro Ile Leu Lys Ala Glu Ser Gly Ser Asp His Gly
35           40           45           50
Tyr Asp Val Thr Asp Pro Ala Val Val Asp Pro Glu Arg Gly Gly Pro Glu
      55           60           65
Gly Leu Ala Ala Val Ser Lys Ala Ala Arg Gly Ala Gly Met Gly Val Leu
70           75           80           85
Ile Asp Ile Val Pro Asn His Val Gly Val Ala Ser Pro Pro Gln Asn Pro
      90           95           100
Trp Trp Trp Ser Leu Leu Lys Glu Gly Arg Gly Ser Pro Tyr Ala Val Ala
105           110           115
Phe Asp Val Asp Trp Asp Leu Ala Gly Gly Arg Ile Arg Ile Pro Val Leu
120-----125-----130-----135-----
Gly Ser Asp Asp Asp Leu Asp Gln Leu Glu Ile Lys Asp Gly Glu Leu Arg
      140           145           150
Tyr Tyr Asp His Arg Phe Pro Leu Ala Glu Gly Ser Tyr Arg Asp Gly Asp
155           160           165           170
Ser Pro Gln Asp Val His Gly Arg Gln His Tyr Glu Leu Ile Gly Trp Arg
      175           180           185
Arg Ala Asp Asn Glu Leu Asn Tyr Arg Arg Phe Phe Ala Val Asn Thr Leu
190           195           200
Ala Gly Ile Arg Val Glu Val Pro Pro Val Phe Asp Glu Ala His Gln Glu
205           210           215           220
Val Val Arg Trp Phe Arg Ala Gly Leu Ala Asp Gly Leu Arg Ile Asp His
      225           230           235
Pro Asp Gly Leu Ala Asp Pro Glu Gly Tyr Leu Lys Arg Leu Arg Glu Val
240           245           250           255
Thr Gly Gly Ala Tyr Leu Leu Ile Glu Lys Ile Leu Glu Pro Gly Glu Gln
      260           265           270
Leu Pro Ala Ser Phe Glu Cys Glu Gly Thr Thr Gly Tyr Asp Ala Leu Ala
275           280           285
Asp Val Asp Arg Val Phe Val Asp Pro Arg Gly Gln Val Pro Leu Asp Arg
290           295           300           305
Leu Asp Ala Arg Leu Arg Gly Gly Ala Pro Ala Asp Tyr Glu Asp Met Ile

```

31
 310
 Arg Gly Thr Lys Arg Arg Ile Thr Asp Gly Ile Leu His Ser Glu Ile Leu
 325 330 335 340
 Arg Leu Ala Arg Leu Val Pro Glu Gln Thr Gly Ile Pro Gly Glu Ala Ala
 345 350 355
 Ala Asp Ala Ile Ala Glu Ile Ile Ala Ala Phe Pro Val Tyr Arg Ser Tyr
 360 365 370
 Leu Pro Glu Gly Ala Glu Ile Leu Lys Glu Ala Cys Asp Leu Ala Ala Arg
 375 380 385 390
 Arg Arg Pro Glu Leu Gly Gln Thr Val Gln Leu Leu Gln Pro Leu Leu Leu
 395 400 405
 Asp Thr Asp Leu Glu Ile Ser Arg Arg Phe Gln Gln Thr Ser Gly Met Val
 410 415 420 425
 Met Ala Lys Gly Val Glu Asp Thr Ala Phe Phe Arg Tyr Asn Arg Leu Gly
 430 435 440
 Thr Leu Thr Glu Val Gly Ala Asp Pro Thr Glu Phe Ser Leu Glu Pro Glu
 445 450 455
 Glu Phe His Val Arg Met Ala Arg Arg Gln Ala Glu Leu Pro Leu Ser Met
 460 465 470 475
 Thr Thr Leu Ser Thr His Asp Thr Lys Arg Ser Glu Asp Thr Arg Ala Arg
 480 485 490
 Ile Ser Val Ile Ala Glu Val Ala Pro Glu Trp Glu Lys Ala Leu Asp Arg
 495 500 505 510
 Leu Asn Thr Leu Ala Pro Leu Pro Asp Gly Pro Leu Ser Thr Leu Leu Trp
 515 520 525
 Gln Ala Ile Ala Gly Ala Trp Pro Ala Ser Arg Glu Arg Leu Gln Ser Tyr
 530 535 540
 Ala Leu Lys Ala Ala Arg Glu Ala Gly Asn Ser Thr Ser Trp Thr Asp Pro
 545 550 555 560
 Asp Pro Ala Phe Glu Glu Ala Leu Ser Ala Val Val Asp Ser Ala Phe Asp
 565 570 575
 Asn Pro Glu Val Arg Ala Glu Leu Glu Ala Leu Val Gly Leu Leu Ala Pro
 580 585 590 595
 His Gly Ala Ser Asn Ser Leu Ala Ala Lys Leu Val Gln Leu Thr Met Pro
 600 605 610
 Gly Val Pro Asp Val Tyr Gln Gly Thr Glu Phe Trp Asp Arg Ser Leu Thr
 615 620 625
 Asp Pro Asp Asn Arg Arg Pro Phe Ser Phe Ala Glu Arg Ile Arg Ala Leu
 630 635 640 645
 Asp Gln Leu Asp Ala Gly His Arg Pro Asp Ser Phe Gln Asp Glu Ala Val
 650 655 660
 Lys Leu Leu Val Thr Ser Arg Ala Leu Arg Leu Arg Arg Asn Arg Pro Glu
 665 670 675 680
 Leu Phe Thr Gly Tyr Arg Pro Val His Ala Arg Gly Pro Ala Ala Gly His
 685 690 695
 Leu Val Ala Phe Asp Arg Gly Ala Gly Gly Val Leu Ala Leu Ala Thr Arg
 700 705 710
 Leu Pro Tyr Gly Leu Glu Gln Ser Gly Gly Trp Arg Asp Thr Ala Val Glu
 715 720 725 730
 Leu Glu Ala Ala Met Thr Asp Glu Leu Thr Gly Ser Thr Phe Gly Pro Gly

33

34

735 740 745
 Pro Ala Ala Leu Ser Glu Val Phe Arg Ala Tyr Pro Val Ala Leu Leu Val
 750 755 760 765
 Pro Ala Thr Gly Gly Lys Ser
 770

【0102】配列番号: 2

配列の長さ: 775

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ポリペプチド

配列

Met Arg Thr Pro Val Ser Thr Tyr Arg Leu Gln Ile Arg Lys Gly Phe Thr
 1 5 10 15
 Leu Phe Asp Ala Ala Lys Thr Val Pro Tyr Leu His Ser Leu Gly Val Asp
 20 25 30
 Trp Val Tyr Leu Ser Pro Val Leu Thr Ala Glu Gln Gly Ser Asp His Gly
 35 40 45 50
 Tyr Asp Val Thr Asp Pro Ser Ala Val Asp Pro Glu Arg Gly Gly Pro Glu
 55 60 65
 Gly Leu Ala Ala Val Ser Lys Ala Ala Arg Ala Ala Gly Met Gly Val Leu
 70 75 80 85
 Ile Asp Ile Val Pro Asn His Val Gly Val Ala Thr Pro Ala Gln Asn Pro
 90 95 100
 Trp Trp Trp Ser Leu Leu Lys Glu Gly Arg Gln Ser Arg Tyr Ala Glu Ala
 105 110 115
 Phe Asp Val Asp Trp Asp Leu Ala Gly Gly Arg Ile Arg Leu Pro Val Leu
 120 125 130 135
 Gly Ser Asp Asp Asp Leu Asp Gln Leu Glu Ile Arg Asp Gly Glu Leu Arg
 140 145 150
 Tyr Tyr Asp His Arg Phe Pro Leu Ala Glu Gly Thr Tyr Ala Glu Gly Asp
 155 160 165 170
 Ala Pro Arg Asp Val His Ala Arg Gln His Tyr Glu Leu Ile Gly Trp Arg
 175 180 185
 Arg Ala Asp Asn Glu Leu Asn Tyr Arg Arg Phe Phe Ala Val Asn Thr Leu
 190 195 200
 Ala Gly Val Arg Val Glu Ile Pro Ala Val Phe Asp Glu Ala His Gln Glu
 205 210 215 220
 Val Val Arg Trp Phe Arg Glu Asp Leu Ala Asp Gly Leu Arg Ile Asp His
 225 230 235
 Pro Asp Gly Leu Ala Asp Pro Glu Gly Tyr Leu Lys Arg Leu Arg Glu Val
 240 245 250 255
 Thr Gly Gly Ala Tyr Leu Leu Ile Glu Lys Ile Leu Glu Pro Gly Glu Gln
 260 265 270
 Leu Pro Ala Ser Phe Glu Cys Glu Gly Thr Thr Gly Tyr Asp Ala Leu Ala
 275 280 285
 Asp Val Asp Arg Val Leu Val Asp Pro Arg Gly Gln Glu Pro Leu Asp Arg
 290 295 300 305
 Leu Asp Ala Ser Leu Arg Gly Gly Glu Pro Ala Asp Tyr Gln Asp Met Ile
 310 315 320
 Arg Gly Thr Lys Arg Arg Ile Thr Asp Gly Ile Leu His Ser Glu Ile Leu
 325 330 335 340
 Arg Leu Ala Arg Leu Val Pro Gly Asp Ala Asn Val Ser Ile Asp Ala Gly

35																				36
				345					350											355
Ala	Asp	Ala	Leu	Ala	Glu	Ile	Ile	Ala	Ala	Phe	Pro	Val	Tyr	Arg	Thr	Tyr				
	360							365					370							
Leu	Pro	Glu	Gly	Ala	Glu	Val	Leu	Lys	Glu	Ala	Cys	Glu	Leu	Ala	Ala	Arg				
375								380					385							390
Arg	Arg	Pro	Glu	Leu	Asp	Gln	Ala	Ile	Gln	Ala	Leu	Gln	Pro	Leu	Leu	Leu				
			395						400					405						
Asp	Thr	Asp	Leu	Glu	Leu	Ala	Arg	Arg	Phe	Gln	Gln	Thr	Ser	Gly	Met	Val				
410							415					420								425
Met	Ala	Lys	Gly	Val	Glu	Asp	Thr	Ala	Phe	Phe	Arg	Tyr	Asn	Arg	Leu	Gly				
				430						435					440					
Thr	Leu	Thr	Glu	Val	Gly	Ala	Asp	Pro	Thr	Glu	Phe	Ala	Val	Glu	Pro	Asp				
	445						450					455								
Glu	Phe	His	Ala	Arg	Leu	Ala	Arg	Arg	Gln	Ala	Glu	Leu	Pro	Leu	Ser	Met				
460					465					470					475					
Thr	Thr	Leu	Ser	Thr	His	Asp	Thr	Lys	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Arg	Ala	Arg				
			480					485					490							
Ile	Ser	Val	Ile	Ser	Glu	Val	Ala	Gly	Asp	Trp	Glu	Lys	Ala	Leu	Asn	Arg				
495						500					505				510					
Leu	Arg	Asp	Leu	Ala	Pro	Leu	Pro	Asp	Gly	Pro	Leu	Ser	Ala	Leu	Leu	Trp				
				515					520					525						
Gln	Ala	Ile	Ala	Gly	Ala	Trp	Pro	Ala	Ser	Arg	Glu	Arg	Leu	Gln	Tyr	Tyr				
	530						535					540								
Ala	Leu	Lys	Ala	Ala	Arg	Glu	Ala	Gly	Asn	Ser	Thr	Asn	Trp	Thr	Asp	Pro				
545					550					555					560					
Ala	Pro	Ala	Phe	Glu	Glu	Lys	Leu	Lys	Ala	Ala	Val	Asp	Ala	Val	Phe	Asp				
			565					570				575								
Asn	Pro	Ala	Val	Gln	Ala	Glu	Val	Glu	Ala	Leu	Val	Glu	Leu	Leu	Glu	Pro				
580					585					590										

【0103】配列番号: 3

配列の長さ: 2316

配列の型: 核酸

トポロジー: 直鎖状

配列

ATGAGGACAC CCGCCTCGAC CTACCGGCTG CAGATCAGGC GGGGTTTCAC GCTGTTTGAT 60
 GCCGCCGAGA CCGTGCCCTA CCTGAAGTCA CTCGGGGTGG ACTGGATCTA CCTGTCGCCC 120
 ATCCTGAAGG CAGAGAGCGG CTCCGACCAC GGCTATGACG TCACCGATCC CGCCGTAGTG 180
 GACCCGGAGC GCGGGGCCCC TGAAGGGCTG GCCGCGGTGT CCAAGGCGGC CCGCGGTGCC 240
 GGCATGGGCG TGCTGATCGA CATCGTGCCG AACCACGTGG GCGTGGCGTC GCCGCCGAG 300
 AACCCGTGGT GGTGGTCGCT GCTCAAGGAA GGGCGCGGGT CGCCCTACGC CGTGGCGTTC 360
 GACGTCGACT GGGACCTGGC GGGGGGCCGC ATCCGGATCC CCGTCCTGGG CAGCGACGAC 420
 GATCTGGACC AGCTCGAAAT CAAGGACGGC GAGCTGCGGT ACTACGACCA CCGCTTCCCG 480
 CTGGCCGAGG GCAGCTACCG GGACGGCGAC TCCCCGAGG ACGTCCACGG CCGGCAGCAC 540
 TACGAACTCA TCGGCTGGCG GCGCGCCGAC AATGAACTGA ACTACGCGCG GTTCTTCGCG 600
 GTGAACACGC TCGCCGGCAT CCGGGTGGAG GTGCCGCGCG TCTTCGATGA AGCGCACCAG 660
 GAGGTGGTGC GCTGGTTCGG TCGGGGGCTC GCCGACGGGC TGCGGATCGA CCACCCGGAC 720
 GGCTGGCCG ATCCCGAGGG GTATTTGAAG CGGCTCCGTG AGGTACCGG GGGCGCGTAC 780
 CTGCTCATCG AAAAGATCCT CGAGCCGGGC GAACAGTTGC CGGCCAGCTT CGAGTGCGAA 840
 GGCACCACCG GCTACGACGC CCTCGCGGAT GTCGACAGGG TCTTCGTGGA CCCGCGGGGA 900
 CAGGTGCCGC TGGACCGTCT GGACGCACGG CTGCGCGGCG GTGCCCGGC CGACTACGAG 960
 GACATGATCC CCGGACCAA GCGCCGGATC ACCGACGGCA TCCTGCACTC CGAGATCTG 1020
 CGCCTTGCCA GGCTGGTGCC CGAGCAGACC GGAATTCCCG GGGAGGCGGC CGCGGATGCG 1080
 ATCGCGGAGA TCATCGCGGC CTTCCCGGTC TACCGGTCTT ATCTTCCCGA GGGCGCGGAG 1140
 ATCCTGAAGG AGGCCTGCGA CCTCGCCGCG CGGAGGCGTC CGGAACTGGG CCAGACCGTC 1200
 CAGCTGCTGC AGCCGCTGCT GCTGGATACC GACCTCGAGA TTTCCCGCAG GTTCCAGCAG 1260
 ACCTCGGGAA TGGTCATGGC CAAAGGCGTG GAGGACACCG CGTCTTCCG CTACAACCGG 1320
 CTGGGAACGC TCACCGAGGT GGGCGCCGAC CCCACCGAGT TCTCGCTGGA ACCGGAGGAG 1380
 TTTCACGTCC GGATGGCCCG CCGGCAGGCC GAACTCCCGC TCTCCATGAC CACCCTGAGC 1440
 ACGCACGACA CCAAGCGCAG CGAGGACACC CGGGCCCGGA TCTCGGTGAT CGCCGAGGTC 1500
 GCGCTGAAT GGGAAAAGGC CCTGGACAGG CTGAACACCC TCCTCCGCT GCCGGACGGC 1560
 CCGCTCTCCA CGCTGCTCTG GCAGGCGATT GCGGGGGCAT GGCCGGCCAG CCGGGAACGC 1620
 CTTACGTCTT ACGCCCTGAA AGCGGCGCGC GAAGCCGGGA ACTCGACCAG CTGGACCGAT 1680
 CCGGACCCGG CATTCGAGGA GGCACCTTCC GCCGTCGTCG ACTCCGCCTT CGACAATCCG 1740
 GAGGTGCGTG CGGAACCTGA GGCCCTGGTG GGCTCCTTG CGCCGCACGG TCGTCCAAC 1800
 TCGCTCGCGG CAAAGCTGT CCAGCTGACC ATGCCGGGCG TTCCGGACGT GTACCAGGGC 1860
 ACCGAGTTCT GGGACAGGTC GCTGACCGAT CCGGACAACC GCGGCCCTT CAGCTTCGCC 1920
 GAACGGATTA GGGCCTTGA CCAGTTGGAC GCCGCCACCC GTCCGGACTC CTTCCAGGAC 1980
 GAGGCGGTCA AGCTGCTGGT CACCTCGAGG GCGCTGCGGC TCGGGCGGAA CCGGCCGAG 2040
 CTCCTACCCG GCTACCGCCC CGTGATGCC AGGGGCCCGG CCGCCGGGCA CCTGGTGGCG 2100
 TTCGACCGCG GCGCCGGGGG AGTGCTGGCG CTTGCCACCC GGCTCCCTA CGGGCTGGAA 2160
 CAGTCGGGCG GCTGGCGGGA CACCGCCGTC GAGCTTGAAG CCGCCATGAC GGACGAACTG 2220
 ACCGGCTCCA CTTTCGGGCC GGGACGGCG GCGCTGTGAG AAGTCTTCCG GGCCTACCCG 2280
 GTGGCCTTGT TGGTCCCCG GACAGGAGGC AAGTCA 2316

【0104】配列番号: 4

配列の長さ: 2325

配列の型: 核酸

トポロジー: 直鎖状

配列

ATGAGAACGC CAGTCTCCAC GTACAGGCTG CAGATCAGGA AGGGATTAC ACTCTTCGAC 60
 GCGGCCAAAA CCGTTCCGTA CCTGCACTCG CTCGGCGTCG ACTGGGTCTA CCTTCTCCG 120
 GTCCTGACTG CCGAGCAGGG CTCCGACCAC GGTACGACG TCACCGATCC CTCGCCCGTC 180
 GACCCCGAAC GCGGCGGGCC GGAGGGCCTC GCGGCGGTTT CCAAGGCGGC CCGCGCCGCG 240

39

40

GGCATGGGCG TGCTGATCGA CATCGTGCCC AACACGTGG GCGTCGCGAC GCCGGCGCAG 300
 AACCCCTGGT GGTGGTCCGT GCTCAAGGAG GGACGCCAGT CCCGTTACGC GGAGGCGTTC 360
 GACGTCGATT GGGACCTCGC CGGGGACGC ATCCGGCTGC CGGTGCTCGG CAGCGACGAT 420
 GACCTCGACC AGCTCGAAAT CAGGGACGGG GAGCTGCGGT ACTACGACCA CCGATTCCCC 480
 CTCGCCGAGG GAACCTACGC CGAAGGCGAC GCGCCGCGGG ATGTCCACGC CCGGCAGCAC 540
 TACGAGCTCA TCGGCTGGCG CCGCGCGGAC AACGAGCTGA ACTACCGCCG CTTTTTCGCG 600
 GTGAACACGC TCGCCGGCGT CCGCGTGAA ATCCCCGCG TCTTCGACGA GGCACACCAG 660
 GAGGTGGTGC GCTGGTTCCG CGAGGACCTT GCGGACGGCC TCGGATCGA CCACCCGGAC 720
 GGCTCGCTG ACCCGGAGG GTACCTGAAG CGACTCCGGG AAGTACCCG CCGCGCTTAC 780
 CTGCTGATCG AAAAGATCCT GGAGCCGGG GAGCAGCTGC CCGCCAGCTT CGAGTGTGAA 840
 GGCACCACAG GCTACGACGC CCTCGCCGAC GTCGACCGG TTCTCGTGA CCCGCGCGGC 900
 CAGGAACCGC TGGACCGCT TGACGCGTCC CTGCGTGGC GCGAGCCGC CGACTACCAG 960
 GACATGATCC GCGGAACCA GCGCCGATC ACCGACGGTA TCCTGCACTC GGAGATCTG 1020
 CGGCTGGCCC GGCTGGTTCC GGGCGACGCC AACGTTTCAA TCGACGCCG AGCCGACGCT 1080
 CTCGCCGAAA TCATCGCCGC CTTCCCGTTC TACCGCACCT ACCTGCCGGA GGGCGCCGAG 1140
 GTCCTGAAGG AGGCGTGCGA GCTTGCCGCG CGTAGGCGG CGGAACCGA CCAGGCCATC 1200
 CAGGCTCTGC AGCCGCTGCT GCTGGACACG GACCTCGAGC TTGCCCGCG CTTCCAGCAG 1260
 ACCTCGGGCA TGGTCATGGC CAAGGGCGTG GAGGACACCG CGTTCTTCCG CTACAACCGC 1320
 CTGGGCAACC TCACGGAAGT GGGCGCCGAC CCCACCGAGT TCGCCGTGGA GCCGACGAG 1380
 TTCCACGCCC GGCTGGCAG CCGGCAGGCC GAGCTTCCG TGTCCATGAC GACGCTGAGC 1440
 ACGCACCACA CCAAGCGCAG CGAGGACACC CGAGCAAGGA TTTCGGTCAT TTCCGAGGTT 1500
 GCGGGTGA CT GGGAAAAGG CTTGAACCGG CTGCGCGACC TGGCCCCGCT GCCGGACGGC 1560
 CCGCTGTCCG CGCTGCTCTG GCAGGCCATT GCCGGCGCCT GGCCCGCCAG CCGGGAACGC 1620
 CTGCAGTACT ACGCGCTGAA GGCCGCGCGT GAAGCGGGA ACTCGACCA CTGGACCGAT 1680
 CCGCCCCCGG CGTTCGAGGA GAAGCTGAAG GCCCGGTCG ACGCCGTGT CGACAATCCC 1740
 GCCGTGACG CCGAGGTGGA AGCCCTCGTC GAGCTCCTGG AGCCGTACGG AGCTTCGAAC 1800
 TCCCTCGCCG CCAAGCTCGT GCAGCTGACC ATGCCCGCG TCCCGGACGT CTACCAGGGC 1860
 ACGGAGTTCT GGGACCGGTC GCTGACGGAC CCGGACAACC GCGGCGCGTT CAGCTTCGAC 1920
 GACCGCCGCG CCGCGCTGGA GCAGCTGGAT GCCGCGGACC TTCCCGCGTC ATTTACCGAT 1980
 GAGCGGACGA AGCTGCTAGT GACGTCGCG CCGCTGCGG TCGCGCGGA CCGTCCGAG 2040
 CTGTTACAGG GGTACCGGCC GGTCTGCGC AGCGGCGCG CCGCCGGGCA CCTGCTCGCG 2100
 TTCGACCGCG GCACCGCGC GCGCCCGGT GCATTGACCC TCGCCACGCG GCTTCCCTAC 2160
 GGGCTGGAAC AGTCGGGTGG ATGGCGGGAC ACCGCCGTC AACTTAACAC CGCCATGAAA 2220
 GACGAAGTGA CCGGTGCCG CTTGCGACCG GGGGACGTA AGATCGCCGA CATCTTCCG 2280
 TCGTTCCCGG TTGCGCTGCT GGTGCCGAG ACAGGAGGAG AGTCA 2325

【 0 1 0 5 】 配列番号 : 5

配列の長さ : 2936

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

配列の特徴

起源

生物名 : リゾビウム・スピーシーズ (Rhizobium sp.)

株名 : M-11 (FERM BP-4130)

配列の特徴

特徴を表わす記号 : 5' UTR

存在位置 : 1..564

特徴を決定した方法 : E

40 特徴を表わす記号 : mat peptide

存在位置 : 565..2880

特徴を決定した方法 : S

特徴を表わす記号 : 3' UTR

存在位置 : 2881..2936

特徴を決定した方法 : E

配列

CGTGCTCTAC TTCAACGCGC ACGACGGCGA CGTCGTGTTT AAGTCCCGT CGGATGAATA 60
 CGCCCCGGCC TGGGACGTCA TCATCGACAC CGCCGGCGCG GGTGCCGATT CCGAACCCGT 120
 GCAGGCTGGC GGCAACTCA CCGTGGCAGC GAAATCGCTC GTGGTGCTCC GTGCCACAG 180
 CGCCCCGAG GAGGAACCG ACCACTCGT GCGCGCTCC CTCGACGCG TGACGCAGAC 240

41	42
TGCGACCGCC GAAACCGCGG CGCTCACCGC CCCCACCGTT CCGGAGCCGA GGAAGACCAA 300	
GAAGGCAGCG CCGAAGCCGG AAGAGGAGGC TCCCGACGAG GCGGCGCCGA AGCCGGAAGA 360	
GAAGGCTCCC GACGAGGCGG CGGCGAAGCC GGAAGAGGCT GCTTCCGACG AGGCGGCGGC 420	
GAAGCCGGAA GAGAAGGCTC CCGACGAGGC GCGGCGCAAG CCGGAAGAGG CTGCTCCGA 480	
CGAGGCGGCG GCGAAGCCCG CGGGGAAGGC AGCGGCCAAA ACGGCCGGCA GCGGAGCGCC 540	
AGGCAAGCAG GCGGGACGG GCTC 564	
ATG AGG ACA CCC GCC TCG ACC TAC CGG CTG CAG ATC AGG CGG GGT TTC 612	
Met Arg Thr Pro Ala Ser Thr Tyr Arg Leu Gln Ile Arg Arg Gly Phe	
1 5 10 15	
ACG CTG TTT GAT GCC GCC GAG ACC GTG CCC TAC CTG AAG TCA CTC GGG 660	
Thr Leu Phe Asp Ala Ala Glu Thr Val Pro Tyr Leu Lys Ser Leu Gly	
20 25 30	
GTG GAC TGG ATC TAC CTG TCG CCC ATC CTG AAG GCA GAG AGC GGC TCC 708	
Val Asp Trp Ile Tyr Leu Ser Pro Ile Leu Lys Ala Glu Ser Gly Ser	
35 40 45	
GAC CAC GGC TAT GAC GTC ACC GAT CCC GCC GTA GTG GAC CCG GAG CGC 756	
Asp His Gly Tyr Asp Val Thr Asp Pro Ala Val Val Asp Pro Glu Arg	
50 55 60	
GGC GGC CCT GAA GGG CTG GCC GCG GTG TCC AAG GCG GCC CGC GGT GCC 804	
Gly Gly Pro Glu Gly Leu Ala Ala Val Ser Lys Ala Ala Arg Gly Ala	
65 70 75 80	
GGC ATG GGC GTG CTG ATC GAC ATC GTG CCG AAC CAC GTG GGC GTG GCG 852	
Gly Met Gly Val Leu Ile Asp Ile Val Pro Asn His Val Gly Val Ala	
85 90 95	
TCG CCG CCG CAG AAC CCG TGG TGG TGG TCG CTG CTC AAG GAA GGC CGC 900	
Ser Pro Pro Gln Asn Pro Trp Trp Trp Ser Leu Leu Lys Glu Gly Arg	
100 105 110	
GGG TCG CCC TAC GCC GTG GCG TTC GAC GTC GAC TGG GAC CTG GCG GGG 948	
Gly Ser Pro Tyr Ala Val Ala Phe Asp Val Asp Trp Asp Leu Ala Gly	
115 120 125	
GGC CGC ATC CGG ATC CCC GTC CTG GGC AGC GAC GAC GAT CTG GAC CAG 996	
Gly Arg Ile Arg Ile Pro Val Leu Gly Ser Asp Asp Asp Leu Asp Gln	
130 135 140	
CTC GAA ATC AAG GAC GGC GAG CTG CGG TAC TAC GAC CAC CGC TTC CCG 1044	
Leu Glu Ile Lys Asp Gly Glu Leu Arg Tyr Tyr Asp His Arg Phe Pro	
145 150 155 160	
CTG GCC GAG GGC AGC TAC CGG GAC GGC GAC TCC CCG CAG GAC GTC CAC 1092	
Leu Ala Glu Gly Ser Tyr Arg Asp Gly Asp Ser Pro Gln Asp Val His	
165 170 175	
GGC CGG CAG CAC TAC GAA CTC ATC GGC TGG CGG CGC GCC GAC AAT GAA 1140	
Gly Arg Gln His Tyr Glu Leu Ile Gly Trp Arg Arg Ala Asp Asn Glu	
180 185 190	
CTG AAC TAC CGC CGG TTC TTC GCG GTG AAC ACG CTC GCC GGC ATC CCG 1188	
Leu Asn Tyr Arg Arg Phe Phe Ala Val Asn Thr Leu Ala Gly Ile Arg	
195 200 205	
GTG GAG GTG CCG CCG GTC TTC GAT GAA GCG CAC CAG GAG GTG GTG CCG 1236	
Val Glu Val Pro Pro Val Phe Asp Glu Ala His Gln Glu Val Val Arg	
210 215 220	
TGG TTC CGT GCG GGC CTC GCC GAC GGC CTG CGG ATC GAC CAC CCG GAC 1284	
Trp Phe Arg Ala Gly Leu Ala Asp Gly Leu Arg Ile Asp His Pro Asp	

43			44
225	230	235	240
GGC CTG GCC GAT CCC GAG GGG TAT TTG AAG CGG CTC CGT GAG GTC ACC			1332
Gly Leu Ala Asp Pro Glu Gly Tyr Leu Lys Arg Leu Arg Glu Val Thr			
	245	250	255
GGG GGC GCG TAC CTG CTC ATC GAA AAG ATC CTC GAG CCG GGC GAA CAG			1380
Gly Gly Ala Tyr Leu Leu Ile Glu Lys Ile Leu Glu Pro Gly Glu Gln			
	260	265	270
TTG CCG GCC AGC TTC GAG TGC GAA GGC ACC ACC GGC TAC GAC GCC CTC			1428
Leu Pro Ala Ser Phe Glu Cys Glu Gly Thr Thr Gly Tyr Asp Ala Leu			
	275	280	285
GCG GAT GTC GAC AGG GTC TTC GTG GAC CCG CGG GGA CAG GTG CCG CTG			1476
Ala Asp Val Asp Arg Val Phe Val Asp Pro Arg Gly Gln Val Pro Leu			
	290	295	300
GAC CGT CTG GAC GCA CGG CTG CGC GGC GGT GCG CCG GCC GAC TAC GAG			1524
Asp Arg Leu Asp Ala Arg Leu Arg Gly Gly Ala Pro Ala Asp Tyr Glu			
	305	310	315
GAC ATG ATC CGC GGG ACC AAG CGC CGG ATC ACC GAC GGC ATC CTG CAC			1572
Asp Met Ile Arg Gly Thr Lys Arg Arg Ile Thr Asp Gly Ile Leu His			
	325	330	335
TCC GAG ATC CTG CGC CTT GCC AGG CTG GTG CCC GAG CAG ACC GGA ATT			1620
Ser Glu Ile Leu Arg Leu Ala Arg Leu Val Pro Glu Gln Thr Gly Ile			
	340	345	350
CCC GGG GAG GCG GCC GCG GAT GCG ATC GCG GAG ATC ATC GCG GCC TTC			1668
Pro Gly Glu Ala Ala Ala Asp Ala Ile Ala Glu Ile Ile Ala Ala Phe			
	355	360	365
CCG GTC TAC CGG TCC TAT CTT CCC GAG GGC GCG GAG ATC CTG AAG GAG			1716
Pro Val Tyr Arg Ser Tyr Leu Pro Glu Gly Ala Glu Ile Leu Lys Glu			
	370	375	380
GCC TGC GAC CTC GCC GCG CGG AGG CGT CCG GAA CTG GGC CAG ACC GTC			1764
Ala Cys Asp Leu Ala Ala Arg Arg Arg Pro Glu Leu Gly Gln Thr Val			
	385	390	395
CAG CTG CTG CAG CCG CTG CTG CTG GAT ACC GAC CTC GAG ATT TCC CGC			1812
Gln Leu Leu Gln Pro Leu Leu Leu Asp Thr Asp Leu Glu Ile Ser Arg			
	405	410	415
AGG TTC CAG CAG ACC TCG GGA ATG GTC ATG GCC AAA GGC GTG GAG GAC			1860
Arg Phe Gln Gln Thr Ser Gly Met Val Met Ala Lys Gly Val Glu Asp			
	420	425	430
ACC GCG TTC TTC CGC TAC AAC CGG CTG GGA ACG CTC ACC GAG GTG GGC			1908
Thr Ala Phe Phe Arg Tyr Asn Arg Leu Gly Thr Leu Thr Glu Val Gly			
	435	440	445
GCC GAC CCC ACC GAG TTC TCG CTG GAA CCG GAG GAG TTT CAC GTC CGG			1956
Ala Asp Pro Thr Glu Phe Ser Leu Glu Pro Glu Glu Phe His Val Arg			
	450	455	460
ATG GCC CGC CGG CAG GCC GAA CTC CCG CTC TCC ATG ACC ACC CTG AGC			2004
Met Ala Arg Arg Gln Ala Glu Leu Pro Leu Ser Met Thr Thr Leu Ser			
	465	470	475
ACG CAC GAC ACC AAG CGC AGC GAG GAC ACC CGG GCC CGG ATC TCG GTG			2052
Thr His Asp Thr Lys Arg Ser Glu Asp Thr Arg Ala Arg Ile Ser Val			
	485	490	495
ATC GCC GAG GTC GCG CCT GAA TGG GAA AAG GCC CTG GAC AGG CTG AAC			2100

45	46
Ile Ala Glu Val Ala Pro Glu Trp Glu Lys Ala Leu Asp Arg Leu Asn	
500	505 510
ACC CTC GCT CCG CTG CCG GAC GGC CCG CTC TCC ACG CTG CTC TGG CAG	2148
Thr Leu Ala Pro Leu Pro Asp Gly Pro Leu Ser Thr Leu Leu Trp Gln	
515	520 525
GCG ATT GCG GGG GCA TGG CCG GCC AGC CGG GAA CGC CTT CAG TCC TAC	2196
Ala Ile Ala Gly Ala Trp Pro Ala Ser Arg Glu Arg Leu Gln Ser Tyr	
530	535 540
GCC CTG AAA GCG GCG CGC GAA GCC GGG AAC TCG ACC AGC TGG ACC GAT	2244
Ala Leu Lys Ala Ala Arg Glu Ala Gly Asn Ser Thr Ser Trp Thr Asp	
545	550 555 560
CCG GAC CCG GCA TTC GAG GAG GCA CTT TCC GCC GTC GTC GAC TCC GCC	2292
Pro Asp Pro Ala Phe Glu Glu Ala Leu Ser Ala Val Val Asp Ser Ala	
565	570 575
TTC GAC AAT CCG GAG GTG CGT GCG GAA CTT GAG GCC CTG GTG GGC CTC	2340
Phe Asp Asn Pro Glu Val Arg Ala Glu Leu Glu Ala Leu Val Gly Leu	
580	585 590
CTT GCG CCG CAC GGT GCG TCC AAC TCG CTC GCG GCA AAG CTT GTC CAG	2388
Leu Ala Pro His Gly Ala Ser Asn Ser Leu Ala Ala Lys Leu Val Gln	
595	600 605
CTG ACC ATG CCG GGC GTT CCG GAC GTG TAC CAG GGC ACC GAG TTC TGG	2436
Leu Thr Met Pro Gly Val Pro Asp Val Tyr Gln Gly Thr Glu Phe Trp	
610	615 620
GAC AGG TCG CTG ACC GAT CCG GAC AAC CGG CGC CCC TTC AGC TTC GCC	2484
Asp Arg Ser Leu Thr Asp Pro Asp Asn Arg Arg Pro Phe Ser Phe Ala	
625	630 635 640
GAA CGG ATT AGG GCC TTG GAC CAG TTG GAC GCC GGC CAC CGT CCG GAC	2532
Glu Arg Ile Arg Ala Leu Asp Gln Leu Asp Ala Gly His Arg Pro Asp	
645	650 655
TCC TTC CAG GAC GAG CCG GTC AAG CTG CTG GTC ACC TCG AGG GCG CTG	2580
Ser Phe Gln Asp Glu Ala Val Lys Leu Leu Val Thr Ser Arg Ala Leu	
660	665 670
CGG CTG CGG CGG AAC CGG CCC GAG CTC TTC ACC GGC TAC CGC CCC GTG	2628
Arg Leu Arg Arg Asn Arg Pro Glu Leu Phe Thr Gly Tyr Arg Pro Val	
675	680 685
CAT GCC AGG GGC CCC GCC GCC GGG CAC CTG GTG GCG TTC GAC CGC GGC	2676
His Ala Arg Gly Pro Ala Ala Gly His Leu Val Ala Phe Asp Arg Gly	
690	695 700
GCC GGG GGA GTG CTG GCG CTT GCC ACC CGG CTC CCC TAC GGG CTG GAA	2724
Ala Gly Gly Val Leu Ala Leu Ala Thr Arg Leu Pro Tyr Gly Leu Glu	
705	710 715 720
CAG TCG GGC GGC TGG CGG GAC ACC GCC GTC GAG CTT GAA GCC GCC ATG	2772
Gln Ser Gly Gly Trp Arg Asp Thr Ala Val Glu Leu Glu Ala Ala Met	
725	730 735
ACG GAC GAA CTG ACC GGC TCC ACT TTC GGG CCG GGA CCG GCG GCG CTG	2820
Thr Asp Glu Leu Thr Gly Ser Thr Phe Gly Pro Gly Pro Ala Ala Leu	
740	745 750
TCA GAA GTC TTC CGG GCC TAC CCG GTG GCC TTG TTG GTC CCC GCG ACA	2868
Ser Glu Val Phe Arg Ala Tyr Pro Val Ala Leu Leu Val Pro Ala Thr	
755	760 765

47

GGA GGC AAG TCA

Gly Gly Lys Ser

770

TGACGCAGCC CAACGATGCG GCCAAGCCGG TGCAGGGAGC GGGGCGCTTC GATATC

2880

2936

【 0 1 0 6 】 配列番号 : 6

配列の長さ : 3084

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

配列の特徴

起源

生物名 : アルスロバクター・スピーシーズ (Arthrobacter sp.)

株名 : Q36 (FERM BP-4316)

配列の特徴

特徴を表わす記号 : 5' UTR

存在位置 : 1..677

特徴を決定した方法 : E

特徴を表わす記号 : mat peptide

10 存在位置 : 678..3002

特徴を決定した方法 : S

特徴を表わす記号 : 3' UTR

存在位置 : 3003..3073

特徴を決定した方法 : E

配列

GATCCGGACG GCAACCTCAT GTCCCCGGAG GACTGGGACA GCGGCTTCGG CCGTTCGGTG	60
GGCATGTTC TCAACGGCGA CGGCATCCAG GGCCACGATG ACCGCGGCCG CCGCATCACG	120
GACGTGAACT TCCTGCTGTA CTCAACGCC CACGACGGCG ACGTCGAGTT CACGCTGCCG	180
CCGGACGAAT ACGCCCCGGC CTGGGACGTC ATCATCGACA CCGCCGGTGA AGGGGCCGAC	240
TCCAAGCCCG CGGACGCCGG AACCATCCTG TCCGTTGCGG CCAAGTCGCT GGTGTGCTT	300
CGCGCCACACA GCGCACCGGA GGAGGAGCCT GACCATTCCG TGGCTGCTTC CCTGGTGCA	360
CTGACGCAGA CCGCCACCGC CGAGACGGCG GCGCTCACAG CTCCTGCCGT TCCGAGCCG	420
GCCAAGACGA AGAAGCCGGC CGCTGACCCG GTTGCTGAAC CGGCCGACCC GCCGGTTGCT	480
GACCCGGCCG ACCCGGTTGC TGACCCGGTT GCTGACCCGG CGCCGGAACC GGCTGCCGAG	540
CCTGCGAAAT CCGCAGCGGA ACCTGGTGCG GAGCCTGCGA AGGACCCGGA GGAGCAGCCG	600
GCGGAAAAGC CGGCGCGCAA GCCTGCGGCA AAGCGCGCGC GCCACCTGAG GGCGGTCAAG	660
CCCGCTGGGG AGGACGC	677
ATG AGA ACG CCA GTC TCC ACG TAC AGG CTG CAG ATC AGG AAG GGA TTC	725
Met Arg Thr Pro Val Ser Thr Tyr Arg Leu Gln Ile Arg Lys Gly Phe	
1 5 10 15	
ACA CTC TTC GAC GCG GCC AAA ACC GTT CCG TAC CTG CAC TCG CTC GGC	773
Thr Leu Phe Asp Ala Ala Lys Thr Val Pro Tyr Leu His Ser Leu Gly	
20 25 30	
GTC GAC TGG GTC TAC CTT TCT CCG GTC CTG ACT GCC GAG CAG GGC TCC	821
Val Asp Trp Val Tyr Leu Ser Pro Val Leu Thr Ala Glu Gln Gly Ser	
35 40 45	
GAC CAC GGG TAC GAC GTC ACC GAT CCC TCC GCC GTC GAC CCC GAA CGC	869
Asp His Gly Tyr Asp Val Thr Asp Pro Ser Ala Val Asp Pro Glu Arg	
50 55 60	
GGC GGG CCG GAG GGC CTC GCG GCG GTT TCC AAG GCG GCC CGC GCC GCG	917
Gly Gly Pro Glu Gly Leu Ala Ala Val Ser Lys Ala Ala Arg Ala Ala	
65 70 75 80	
GGC ATG GGC GTG CTG ATC GAC ATC GTG CCC AAC CAC GTG GGC GTC GCG	965
Gly Met Gly Val Leu Ile Asp Ile Val Pro Asn His Val Gly Val Ala	
85 90 95	
ACG CCG GCG CAG AAC CCC TGG TGG TGG TCG CTG CTC AAG GAG GGA CGC	1013
Thr Pro Ala Gln Asn Pro Trp Trp Trp Ser Leu Leu Lys Glu Gly Arg	
100 105 110	
CAG TCC CGT TAC GCG GAG GCG TTC GAC GTC GAT TGG GAC CTC GCC GGG	1061

49	Gln Ser Arg Tyr Ala Glu Ala Phe Asp Val Asp Trp Asp Leu Ala Gly	50
115	120	125
GGA CGC ATC CGG CTG CCG GTG CTC GGC AGC GAC GAT GAC CTC GAC CAG	1109	
Gly Arg Ile Arg Leu Pro Val Leu Gly Ser Asp Asp Asp Leu Asp Gln		
130	135	140
CTC GAA ATC AGG GAC GGG GAG CTG CGG TAC TAC GAC CAC CGA TTC CCG	1157	
Leu Glu Ile Arg Asp Gly Glu Leu Arg Tyr Tyr Asp His Arg Phe Pro		
145	150	155
CTC GCC GAG GGA ACC TAC GCC GAA GGC GAC GCC CCG CGG GAT GTC CAC	1205	
Leu Ala Glu Gly Thr Tyr Ala Glu Gly Asp Ala Pro Arg Asp Val His		
165	170	175
GCC CGG CAG CAC TAC GAG CTC ATC GGC TGG CGC CGC GCG GAC AAC GAG	1253	
Ala Arg Gln His Tyr Glu Leu Ile Gly Trp Arg Arg Ala Asp Asn Glu		
180	185	190
CTG AAC TAC CGC CGC TTT TTC GCG GTG AAC ACG CTC GCC GGC GTC CGC	1301	
Leu Asn Tyr Arg Arg Phe Phe Ala Val Asn Thr Leu Ala Gly Val Arg		
195	200	205
GTG GAA ATC CCC GCC GTC TTC GAC GAG GCA CAC CAG GAG GTG GTG CGC	1349	
Val Glu Ile Pro Ala Val Phe Asp Glu Ala His Gln Glu Val Val Arg		
210	215	220
TGG TTC CGC GAG GAC CTT GCG GAC GGC CTG CGG ATC GAC CAC CCG GAC	1397	
Trp Phe Arg Glu Asp Leu Ala Asp Gly Leu Arg Ile Asp His Pro Asp		
225	230	235
GGC CTC GCT GAC CCC GAG GGG TAC CTG AAG CGA CTC CGG GAA GTC ACC	1445	
Gly Leu Ala Asp Pro Glu Gly Tyr Leu Lys Arg Leu Arg Glu Val Thr		
245	250	255
GGC GGC GCT TAC CTG CTG ATC GAA AAG ATC CTG GAG CCG GGC GAG CAG	1493	
Gly Gly Ala Tyr Leu Leu Ile Glu Lys Ile Leu Glu Pro Gly Glu Gln		
260	265	270
CTG CCC GCC AGC TTC GAG TGT GAA GGC ACC ACA GGC TAC GAC GCC CTC	1541	
Leu Pro Ala Ser Phe Glu Cys Glu Gly Thr Thr Gly Tyr Asp Ala Leu		
275	280	285
GCC GAC GTC GAC CGG GTT CTC GTG GAC CCG CGC GGC CAG GAA CCG CTG	1589	
Ala Asp Val Asp Arg Val Leu Val Asp Pro Arg Gly Gln Glu Pro Leu		
290	295	300
GAC CGG CTT GAC GCG TCC CTG CGT GGC GGC GAG CCC GCC GAC TAC CAG	1637	
Asp Arg Leu Asp Ala Ser Leu Arg Gly Gly Glu Pro Ala Asp Tyr Gln		
305	310	315
GAC ATG ATC CGC GGA ACC AAG CGC CGG ATC ACC GAC GGT ATC CTG CAC	1685	
Asp Met Ile Arg Gly Thr Lys Arg Arg Ile Thr Asp Gly Ile Leu His		
325	330	335
TCG GAG ATC CTG CGG CTG GCC CGG CTG GTT CCG GGC GAC GCC AAC GTT	1733	
Ser Glu Ile Leu Arg Leu Ala Arg Leu Val Pro Gly Asp Ala Asn Val		
340	345	350
TCA ATC GAC GCC GGA GCC GAC GCT CTC GCC GAA ATC ATC GCC GCC TTC	1781	
Ser Ile Asp Ala Gly Ala Asp Ala Leu Ala Glu Ile Ile Ala Ala Phe		
355	360	365
CCG GTC TAC CGC ACC TAC CTG CCG GAG GGC GCC GAG GTC CTG AAG GAG	1829	
Pro Val Tyr Arg Thr Tyr Leu Pro Glu Gly Ala Glu Val Leu Lys Glu		
370	375	380

51		52
CGC TGC GAG CTT GCC GCG CGT AGG CGG CCG GAA CTC GAC CAG GCC ATC	1877	
Ala Cys Glu Leu Ala Ala Arg Arg Arg Pro Glu Leu Asp Gln Ala Ile		
385 390 395 400		
CAG GCT CTG CAG CCG CTG CTG CTG GAC ACG GAC CTC GAG CTT GCC CGG	1925	
Gln Ala Leu Gln Pro Leu Leu Leu Asp Thr Asp Leu Glu Leu Ala Arg		
405 410 415		
CGC TTC CAG CAG ACC TCG GGC ATG GTC ATG GCC AAG GGC GTG GAG GAC	1973	
Arg Phe Gln Gln Thr Ser Gly Met Val Met Ala Lys Gly Val Glu Asp		
420 425 430		
ACC GCG TTC TTC CCG TAC AAC CCG CTG GGC ACC CTC ACG GAA GTG GGC	2021	
Thr Ala Phe Phe Arg Tyr Asn Arg Leu Gly Thr Leu Thr Glu Val Gly		
435 440 445		
GCC GAC CCC ACC GAG TTC GCC GTG GAG CCG GAC GAG TTC CAC GCC CGG	2069	
Ala Asp Pro Thr Glu Phe Ala Val Glu Pro Asp Glu Phe His Ala Arg		
450 455 460		
CTG GCA CGC CGG CAG GCC GAG CTT CCG CTG TCC ATG ACG ACG CTG AGC	2117	
Leu Ala Arg Arg Gln Ala Glu Leu Pro Leu Ser Met Thr Thr Leu Ser		
465 470 475 480		
ACG CAC GAC ACC AAG CGC AGC GAG GAC ACC CGA GCA AGG ATT TCG GTC	2165	
Thr His Asp Thr Lys Arg Ser Glu Asp Thr Arg Ala Arg Ile Ser Val		
485 490 495		
ATT TCC GAG GTT GCG GGT GAC TGG GAA AAG GCC TTG AAC CGG CTG CGC	2213	
Ile Ser Glu Val Ala Gly Asp Trp Glu Lys Ala Leu Asn Arg Leu Arg		
500 505 510		
GAC CTG GCC CCG CTG CCG GAC GGC CCG CTG TCC GCG CTG CTC TGG CAG	2261	
Asp Leu Ala Pro Leu Pro Asp Gly Pro Leu Ser Ala Leu Leu Trp Gln		
515 520 525		
GCC ATT GCC GGC GCC TGG CCC GCC AGC CGG GAA CGC CTG CAG TAC TAC	2309	
Ala Ile Ala Gly Ala Trp Pro Ala Ser Arg Glu Arg Leu Gln Tyr Tyr		
530 535 540		
CGC CTG AAG GCC GCG CGT GAA GCG GGG AAC TCG ACC AAC TGG ACC GAT	2357	
Ala Leu Lys Ala Ala Arg Glu Ala Gly Asn Ser Thr Asn Trp Thr Asp		
545 550 555 560		
CCG GCC CCC GCG TTC GAG GAG AAG CTG AAG GCC GCG GTC GAC GCC GTG	2405	
Pro Ala Pro Ala Phe Glu Glu Lys Leu Lys Ala Ala Val Asp Ala Val		
565 570 575		
TTC GAC AAT CCC GCC GTG CAG GCC GAG GTG GAA GCC CTC GTC GAG CTC	2453	
Phe Asp Asn Pro Ala Val Gln Ala Glu Val Glu Ala Leu Val Glu Leu		
580 585 590		
CTG GAG CCG TAC GGA GCT TCG AAC TCC CTC GCC GCC AAG CTC GTG CAG	2501	
Leu Glu Pro Tyr Gly Ala Ser Asn Ser Leu Ala Ala Lys Leu Val Gln		
595 600 605		
CTG ACC ATG CCC GGC GTC CCG GAC GTC TAC CAG GGC ACG GAG TTC TGG	2549	
Leu Thr Met Pro Gly Val Pro Asp Val Tyr Gln Gly Thr Glu Phe Trp		
610 615 620		
GAC CGG TCG CTG ACG GAC CCG GAC AAC CGG CGG CCG TTC AGC TTC GAC	2597	
Asp Arg Ser Leu Thr Asp Pro Asp Asn Arg Arg Pro Phe Ser Phe Asp		
625 630 635 640		
GAC CGC CGC GCC GCG CTG GAG CAG CTG GAT GCC GGC GAC CTT CCC GCG	2645	
Asp Arg Arg Ala Ala Leu Glu Gln Leu Asp Ala Gly Asp Leu Pro Ala		

53 645 650 655 54

TCA TTT ACC GAT GAG CGG ACG AAG CTG CTA GTG ACG TCG CGC GCG CTG 2693
 Ser Phe Thr Asp Glu Arg Thr Lys Leu Leu Val Thr Ser Arg Ala Leu

660 665 670

CGG CTG CGC CGG GAC CGT CCG GAG CTG TTC ACG GGG TAC CGG CCG GTC 2741
 Arg Leu Arg Arg Asp Arg Pro Glu Leu Phe Thr Gly Tyr Arg Pro Val

675 680 685

CTG GCC AGC GGG CCC GCC GCC GGG CAC CTG CTC GCG TTC GAC CGC GGC 2789
 Leu Ala Ser Gly Pro Ala Ala Gly His Leu Leu Ala Phe Asp Arg Gly

690 695 700

ACC GCG GCG GCG CCG GGT GCA TTG ACC CTC GCC ACG CGG CTT CCC TAC 2837
 Thr Ala Ala Ala Pro Gly Ala Leu Thr Leu Ala Thr Arg Leu Pro Tyr

705 710 715 720

GGG CTG GAA CAG TCG GGT GGA TGG CGG GAC ACC GCC GTC GAA CTT AAC 2885
 Gly Leu Glu Gln Ser Gly Gly Trp Arg Asp Thr Ala Val Glu Leu Asn

725 730 735

ACC GCC ATG AAA GAC GAA CTG ACC GGT GCC GGC TTC GGA CCG GGG GCA 2933
 Thr Ala Met Lys Asp Glu Leu Thr Gly Ala Gly Phe Gly Pro Gly Ala

740 745 750

GTG AAG ATC GCC GAC ATC TTC CGG TCG TTC CCC GTT GCG CTG CTG GTG 2981
 Val Lys Ile Ala Asp Ile Phe Arg Ser Phe Pro Val Ala Leu Leu Val

755 760 765

CCG CAG ACA GGA GGA GAG TCA 3002
 Pro Gln Thr Gly Gly Glu Ser

770 775

TGACGCACAC CTACCCGCGG GAAGCCGCGA AACCCGTCCT GGGCCCCGCA CGCTACGACG 3063
 TCTGGGCGCC C 3073

【0107】配列番号:7

トポロジー:直鎖状

配列の長さ:20

配列の種類:ペプチド

配列の型:アミノ酸

30 フラグメント型:N末端フラグメント

配列

Met Arg Thr Pro Ala Ser Thr Tyr Arg Leu Gln Ile Arg Arg Gly Phe Thr
 1 5 10 15
 Leu Phe Asp
 20

【0108】配列番号:8

トポロジー:直鎖状

配列の長さ:20

配列の種類:ペプチド

配列の型:アミノ酸

フラグメント型:N末端フラグメント

配列

Met Arg Thr Pro Val Ser Thr Tyr Arg Leu Gln Ile Arg Lys Gly Phe Thr
 1 5 10 15
 Leu Phe Asp
 20

【0109】配列番号:9

トポロジー:直鎖状

配列の長さ:21

配列の種類:ペプチド

配列の型:アミノ酸

フラグメント型:中間部フラグメント

配列

Arg Ser Glu Asp Thr Arg Ala Arg Ile Ser Val Ile Ala Glu Val Ala Pro
 1 5 10 15
 Glu Trp Glu Lys

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

Leu Val Gln Leu Thr Met Pro Gly Val Pro Asp Val Tyr Gln Gly Thr Glu

1 5 10 15

Phe Trp Asp Arg

20

10 トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

Leu Val Gln Leu Thr Met Pro Gly Val Pro Asp Val Tyr Gln Gly Thr Glu

1 5 10 15

Phe Trp Asp

20

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

20 フラグメント型：中間部フラグメント

Glu Gly Arg Gln Ser Arg Tyr Ala Glu Ala Phe Asp Val Asp Trp Asp Leu

1 5 10 15

Ala Gly Gly

20

【図8】 酵素Q36のpH安定性を示す図である。

【図 9】 この発明による組換え DNA である pBMT7

の制限酵素地図である。なお、図中、太線表示部は、酵素をコードするDNAを示す。

30 【図 10】この発明による組換えDNAであるpBQT
13の制限酵素地図である。なお、図中、太線表示部
は、酵素をコードするDNAを示す。

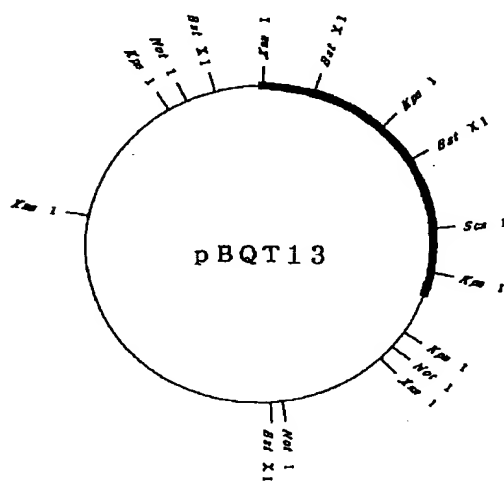
【図 10】この発明による組換え DNA である pBQT 13 の制限酵素地図である。なお、図中、太線表示部は、酵素をコードする DNA を示す。

13の制限酵素地図である。なお、図中、太線表示部は、酵素をコードするDNAを示す。

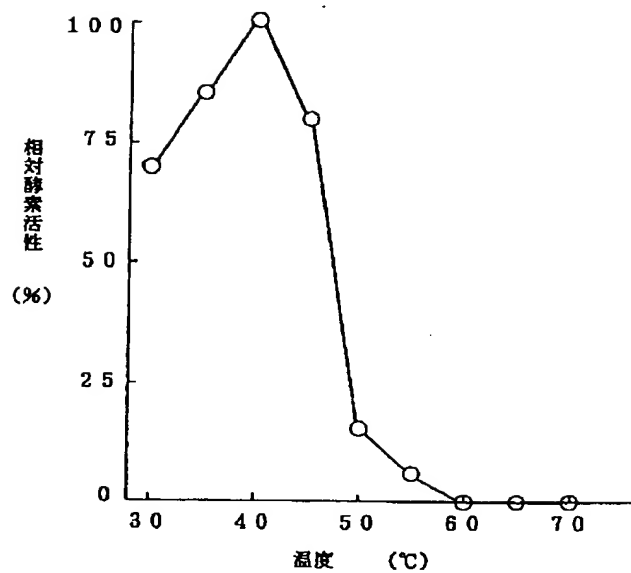
は、酵素をコードするDNAを示す。

は、酵素をコードするDNAを示す。

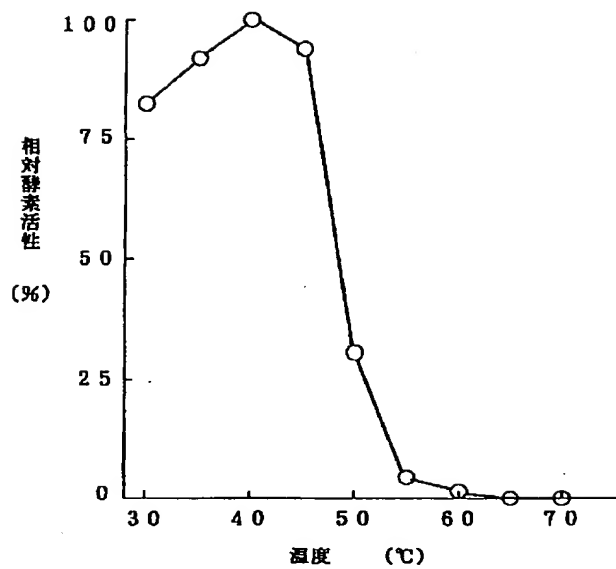
【图 10】



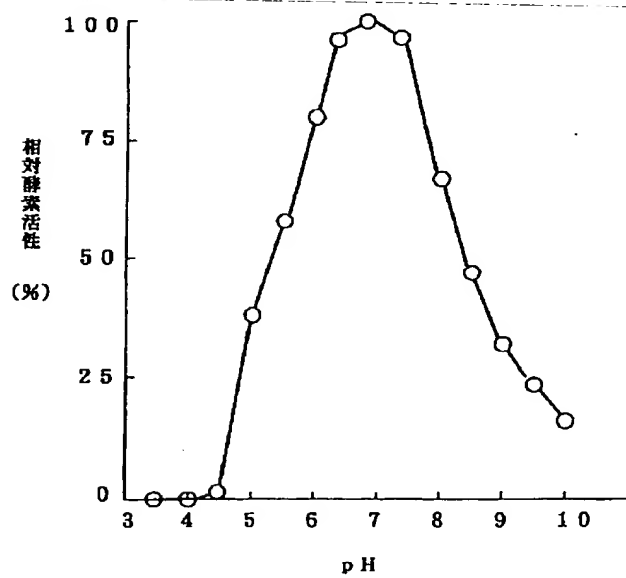
【図1】



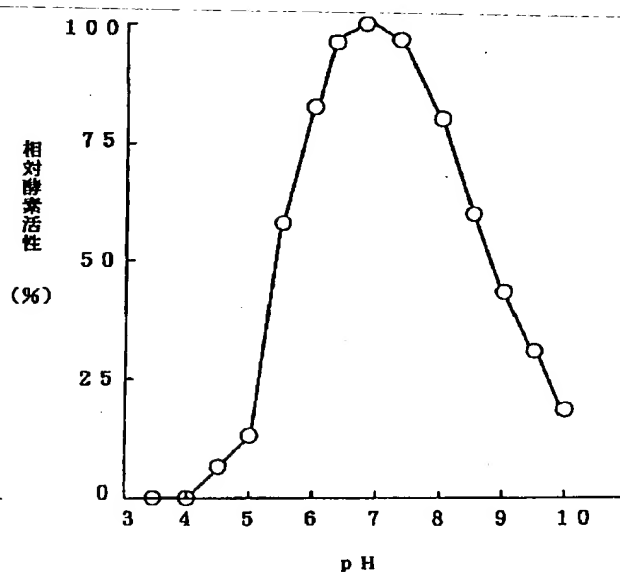
【図2】



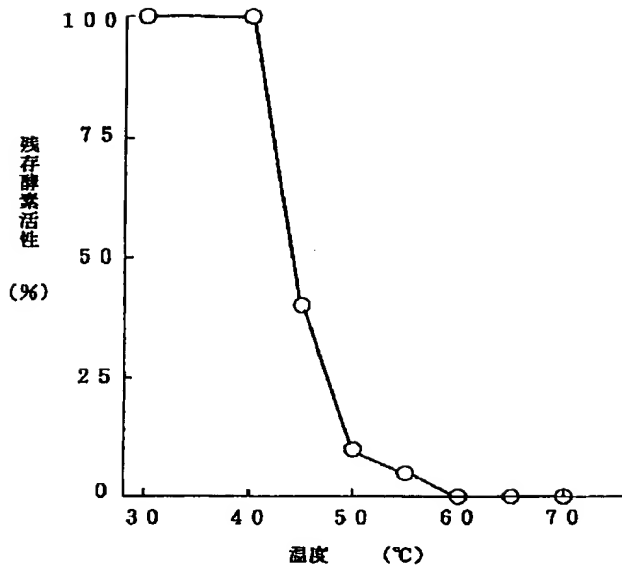
【図3】



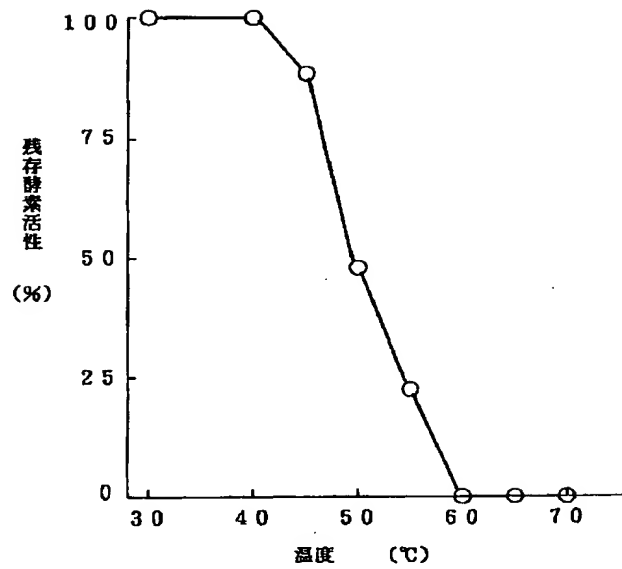
【図4】



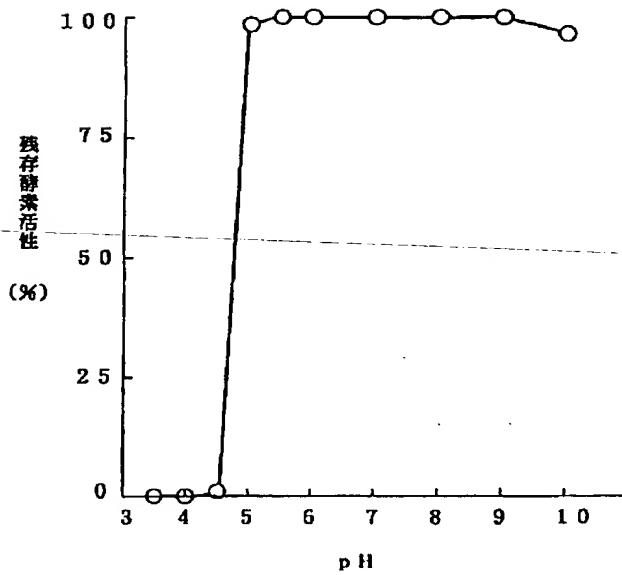
【図 5】



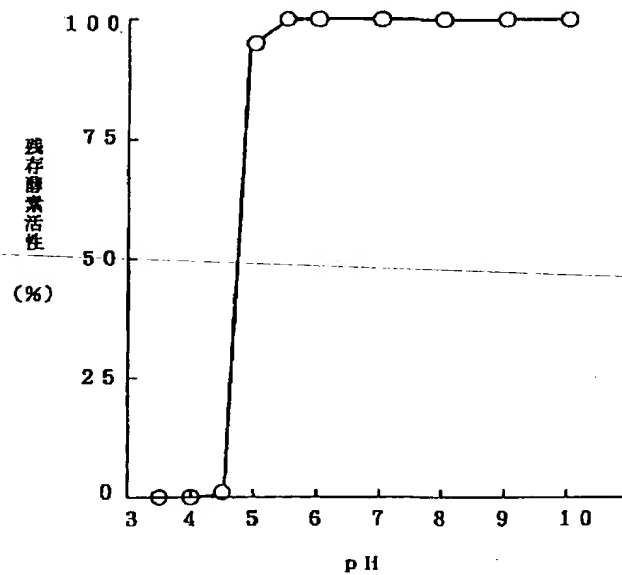
【図 6】



【図 7】



【図 8】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶

(C12N 9/24

C12R 1:19)

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

9281-4B

C12N 15/00

ZNA

A

(C12N 15/00

ZNA

A

C12R 1:41)